



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV PŘÍRODNÍCH POLYFENOLICKÝCH LÁTEK NA  
EXPRESI PROTEÍNU P53**

INFLUENCE OF NATURAL POLYPHENOLIC SUBSTANCES ON P53 PROTEIN EXPRESSION

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Patrik Bušanski**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

**BRNO 2021**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1541/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. Patrik Bušanski**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Vliv přírodních polyfenolických látek na expresi proteínu p53

### Zadání diplomové práce:

Literární rešerše k tématu  
Kultivace bakteriálních kultur  
Izolace plasmidů  
Transformace bakterií do kompetentních kultur  
Testování viability

### Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Patrik Bušanski  
student(ka)

-----  
doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Nádorový supresorový proteín p53 patrí medzi najdôležitejšie regulátory bunkového cyklu pri poškodení DNA. Okrem zastavenia cyklu a opravy DNA, dokáže v krajných prípadoch navodiť programovanú bunkovú smrť – apoptózu. Mutácie génu kódujúcej p53 sú prítomné u viac než 50 % prípadov rakovinových ochorení. Táto diplomová práca skúma alternatívne prírodné polyfenolické látky, ktoré by mohli zvýšiť hladinu a expresiu proteínu p53 v nádorových bunkách. Práve prírodné látky by mohli byť alternatívou nešpecifických cytostatík, ktoré prinášajú mnoho nežiadúcich vedľajších účinkov počas liečby.

V teoretickej časti diplomovej práce je vysvetlená štruktúra a vlastnosti proteínu p53 a sú popísané alternatívne terapeutické prístupy so zameraním na polyfenolické látky. Cieľom experimentálnej časti bolo zistiť vplyv kurkumínu a resveratrolu v porovnaní s často využívaným cytostatikom, doxorubicínom, na viabilitu nádorových buniek a hladinu proteínu p53. Taktiež bol preskúmaný vplyv týchto látok na väzbu p53 na DNA v kvasinkových systémoch. Bolo zistené, že účinnosť doxorubicínu je v porovnaní s polyfenolickými látkami mnohokrát vyššia, avšak použité polyfenolické látky by mohli byť vhodnou alternatívou pri liečbe nádorov, vďaka schopnosti spúšťať apoptózu. Pre resveratrol bola jednoznačne preukázaná súvislosť medzi navodenou programovanou smrťou a zvýšenou expresiou proteínu p53.

Kľúčové slová: proteín p53, rakovina, kurkumín, resveratrol, doxorubicín

## ABSTRACT

The tumor suppressor protein p53 is one of the major regulators of the cell cycle after DNA damage. In addition to stopping the cycle and repairing DNA, it can, in extreme cases, induce programmed cell death - apoptosis. Mutations in the gene encoding p53 are present in more than 50% of cancer cases. This thesis examines alternative natural polyphenolic substances that could increase the level and expression of p53 protein in tumor cells. These substances could be an alternative to non-specific cytostatics, which bring many undesirable additional effects during treatment.

In the theoretical part of the thesis the structure and properties of the p53 protein and describes alternative therapeutic approaches with a focus on polyphenolic substances is explained. The aim of the experimental part was to determine the effect of curcumin and resveratrol in comparison with often used cytostatic drug, doxorubicin, on cell viability of tumor cells and on p53 protein levels. The effect of these substances on the binding of p53 to DNA in yeast systems was also examined. It was found that doxorubin efficiency is many times higher than the examined polyphenolic agents, but resveratrol was showing some potential as a suitable alternative in the treatment of tumors, thanks to the ability to activate apoptosis. It was clearly demonstrated that there is an association between induced programmed death and increased p53 protein expression after resveratrol treatment.

Key words: p53 protein, cancer, curcumin, resveratrol, doxorubicin

BUŠANSKI, Patrik. *Vliv přírodních polyfenolických látek na expresi proteinu p53* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-05-21]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131454>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Václav Brázda.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa rád poďakoval svojmu vedúcemu práce, doc. Mgr. Václavovi Brázdovi, Ph.D., a tiež mojej konzultantke Ing. Otílii Porubiakovej za odborné vedenie, ochotu, cenné rady a čas, ktorý mi venovali pri vypracovaní tejto práce. Tiež ďakujem za príjemné pracovné prostredie kolektívu oddelenia Biofyzikálne chémie a molekulárnej onkológie biofyzikálneho ústavu Akadémie vied ČR, kde bola táto práca spracovávaná.

## Obsah

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	8
2.1	Proteín p53 .....	8
2.1.1	Štruktúra proteínu p53 a väzbová aktivita k DNA .....	8
2.1.2	Mutácie proteínu p53 .....	9
2.1.3	Regulácia a aktivita proteínu p53 v bunkách.....	10
2.2	Možné terapeutické prístupy .....	11
2.2.1	Chemoterapeutiká .....	12
2.2.2	Polyfenolické látky s možnými terapeutickými účinkami .....	13
2.3	Metódy testovania viability po pôsobení chemoterapeutík a prírodných toxínov ..	17
2.3.1	Spektroskopické testy viability .....	17
2.3.2	Sledovanie viability pomocou prietokovej cytometrie .....	19
2.4	Modelové systémy na testovanie vplyvu polyfenolických látok .....	20
2.4.1	Tkaninové kultúry MCF-7 .....	20
2.4.2	Kvasinky <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	20
3	Experimentálna časť .....	21
3.1	Cieľ práce .....	21
3.2	Materiály a prístroje .....	22
3.2.1	Chemikálie .....	22
3.2.2	Ostatné materiály .....	23
3.2.3	Laboratórne prístroje .....	23
3.3	Metódy .....	24
3.3.1	Zloženie roztokov, médií a puferov .....	24
3.4	Testy viability na bunkových línii MCF-7 .....	25
3.4.1	Príprava bunkových línii MCF-7 .....	25
3.4.2	Testy viability MTT .....	25
3.4.3	Testovanie pôsobenia použitých látok pomocou spektrálnej prietokovej cytometrie .....	27
3.5	Analýza hladiny proteínu p53 v bunkových línii MCF-7 .....	27
3.5.1	Príprava lyzátu .....	27
3.5.2	Stanovenie koncentrácie celkových proteínov v lyzáte pomocou Bradfordovej metódy .....	27
3.5.3	Analýza proteínov pomocou SDS-PAGE elektroforézy .....	28
3.5.4	Imunodetekcia proteínu p53 Westernovým prenosom .....	28
3.6	Príprava plazmidovej DNA .....	29
3.6.1	Príprava kompetentných buniek .....	29
3.6.2	Transformácia plazmidovej DNA do <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.6.3	Izolácia plazmidovej DNA .....	30
3.6.4	Analýza izolovanej DNA pomocou agarovej elektroforézy .....	30
3.6.5	Transformácia plazmidovej DNA do kvasinkových expresných systémov ...	31
3.6.6	Luciferázový reportérový test .....	32
4	Výsledky a diskusia .....	33
4.1	Testy viability na bunkovej línii MCF-7 .....	33
4.2	Analýza hladiny proteínu p53 v bunkových línii MCF-7 .....	39
4.2.1	Analýza celkovej koncentrácie proteínov po ošetrovaní .....	39

4.2.2	Analýza hladiny proteínu p53.....	40
4.3	Príprava plazmidovej DNA pre transformáciu do kvasinkových systémov .....	43
4.4	Analýza transaktivačného potenciálu proteínu p53 .....	45
5	Záver.....	55
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	56
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV .....	61

# 1 ÚVOD

Nádorové ochorenia patria dnes medzi najčastejšie príčiny úmrtia celosvetovo. Za ich vznik môže najčastejšie nesprávny životný štýl – zlé stravovacie návyky, fajčenie, alkohol, stres či nedostatok pohybu. Nádorová bunka sa líši od normálnej bunky predovšetkým svojou narušenou schopnosťou nekontrolovateľného delenia [1]. U normálnych zdravých buniek je bunkový cyklus veľmi presne regulovaný niekoľkými mechanizmami. Jedným z kľúčových regulačných faktorov je proteín p53, ktorý pri poškodení DNA môže spôsobiť zastavenie bunkového cyklu, opravu DNA alebo navodenie programovanej bunkovej smrti, čiže apoptózy [2], [3]. S rozdielnou afinitou sa viaže cieľovú sekvenciu DNA a lokálne štruktúry DNA. Mutáciou tohto proteínu môže dochádzať k stratám schopnosti potláčať nádorové bujnenie a naopak mutantné p53 môžu iniciovať vznik nádoru [4].

Reaktivácia pôvodných funkcií v zmutovaných proteínoch p53 môže byť jedna z alternatív pri liečbe rakovinových ochorení [5]. Momentálna liečba využíva nešpecifických cytostatík, ktoré však prinášajú mnohé nežiadúce vedľajšie účinky, ako napríklad tráviace poruchy, zníženie imunity či vypadávanie vlasov. Tieto vedľajšie účinky, ktoré môžu pretrvávať ešte dlho po liečbe, predstavujú hlavný problém pri výbere a aplikácii cytostatík [6]. Je teda prioritou nájsť alternatívne zdroje protirakovinových zlúčenín, ktoré by boli schopné obnoviť funkcie p53. Okrem synteticky vytvorených polypeptidov existuje niekoľko prírodných polyfenolických látok s možnými terapeutickými účinkami [7]. Tieto látky sú známe už niekoľko storočí kvôli svojim blahodarným účinkom na zdravie a v posledných rokoch sa stali predmetom mnohých protirakovinových štúdií. Niektoré polyfenolické látky, ako napríklad kurkumín, resveratrol alebo epikatechíny, sú schopné modulovať aktivitu onkogénov a majú podobné vlastnosti ako proteín p53, teda sú schopné zastaviť bunkový cyklus a navodiť apoptózu [8], [9].

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

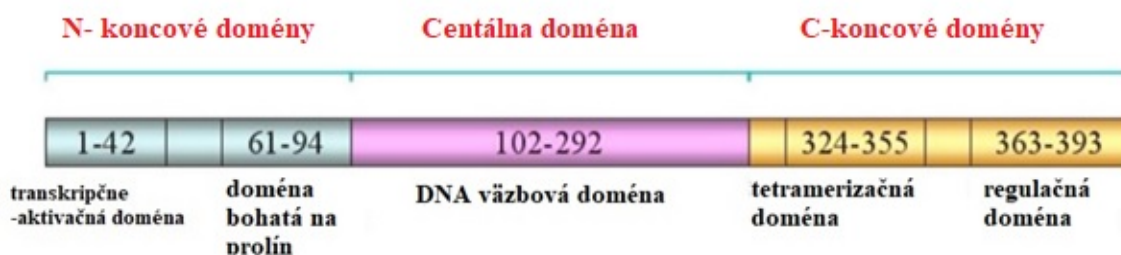
### 2.1 Proteín p53

Proteín p53 bol objavený v druhej polovici 20. storočia pri skúmaní onkovírusov. V roku 1979 pri výskume myšacej bunky transfekovanej vírom *SV40* bola zistená produkcia proteínu, ktorý tvoril komplex s veľkým T antigénom tohto vírusu. Trvalo skoro 10 rokov, kým vedci prišli na to, že proteín p53 nie je onkogén, ale práve naopak, tumor supresorový proteín. Neskôr bolo presnejšie objasnené, že proteín p53 je súčasťou signálnych dráh, ktorými bunka reaguje na stres a jeho úlohou je minimalizovať škody spôsobené nepriaznivými podmienkami. V skutočnosti sa jedná o transkripčný faktor so schopnosťou navodiť expresiu génov, ktorých výsledkom je zastavenie bunkového cyklu, vďaka čomu má bunka dostatok času na opravu poškodenej DNA. V prípadoch, kde je poškodenie DNA príliš veľké môže proteín p53 pomôcť navodiť programovanú bunkovú smrť, teda apoptózu. Tieto funkcie plní v spolupráci s ďalšími proteínmi p53 rodiny (p63, p73) vďaka interakcii s DNA [10].

Proteín p53 sa nachádza v jadrách buniek po celom tele a je kódovaný génom *TP53*, ktorý je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 17, dlhým 22 kb. Bolo dokázané, že až 50 % všetkých ľudských nádorov obsahuje *TP53* mutáciu a inaktivácia *TP53* génu hrá rozhodujúcu úlohu pri malígnej transformácii. Povaha týchto genetických zmien v rakovinových bunkách je najčastejšie mutácia so zmenou zmyslu (zmena kodónu spôsobí zaradenie inej, chemicky značne odlišnej aminokyseliny) v jednej alele, produkujúca chybný proteín, ktorý sa následne v týchto bunkách vyskytuje vo vysokých koncentráciách [11], [12].

#### 2.1.1 Štruktúra proteínu p53 a väzbová aktivita k DNA

Ľudský proteín p53 je jadrový fosfoproteín, ktorý má 393 aminokyselinových monomérov. Štruktúru p53 je možné rozdeliť na niekoľko funkčných domén, pričom každá doména má jedinečnú úlohu a tým pádom i mutácie v rôznych miestach majú rôzny vplyv na funkčnosť proteínu. N-koncová doména (tvorená aminokyselinami 1-42) obsahuje väzbové miesto pre ubiquitin ligázu zodpovednej pre degradáciu proteínu p53 a transkripčne-aktivačnú doménu, na ktorú sa viažu proteíny transkripčného aparátu bunky. Doména bohatá na prolín (tvorená aminokyselinami 61-94) reguluje transaktiváciu apoptických génov a preto je nevyhnutná pre spustenie programovanej bunkovej smrti. Centrálna DNA väzbová doména (tvorená aminokyselinami 102-292) umožňuje špecifické rozpoznávanie cieľových sekvencií DNA a C-koncová doména obsahuje termodynamicky stabilnú tetramerizačnú doménu (je tvorená aminokyselinami 324-355) a základnú regulačnú doménu (AMK 363-393). Približne 80% mutácií spojených s rakovinou u človeka je lokalizovaných v centrálnej doméne viažucej DNA. Tieto mutácie znemožňujú väzbu na DNA a potlačujú tak tumor supresorové funkcie p53 [2], [13], [14]. Schéma štruktúry proteínu p53 sa nachádza na Obrázku 1.

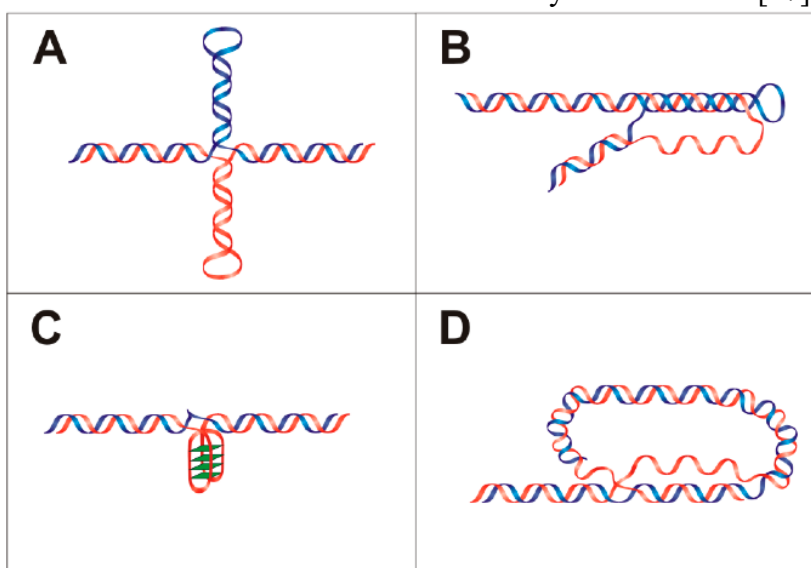


Obrázok 1: Štruktúra proteínu p53 [2].



Proteín p53, ako transkripčný faktor, zohráva kľúčovú úlohu vo viacerých signálnych dráhach k čomu je potrebná vysoká väzbová aktivita k DNA. Väzba p53 k DNA môže byť sekvenčne špecifická alebo nešpecifická. Za sekvenčne špecifickú väzbu zodpovedá centrálna DNA väzbová doména a za nešpecifickú väzbu sa považuje väzba inej oblasti proteínu, napr. k C-koncovej doméne [15]. Táto nešpecifická väzba vyžaduje špecifické kombinácie kofaktorov a posttranslačných modifikácií. Proteín rozpoznáva a viaže cieľovú sekvenciu (konsenzuálnu sekvenciu *p53CON*) pozostávajúcu z dvoch opakujúcich sa motívov oddelených medzerníkom (RRRCWWGYYY, pričom R = purín (A alebo G); W = A alebo T; Y = pyrimidín (C alebo T)). Každá polovica konsezuálnej sekvencie pri väzbe interaguje s dimérom proteínu p53, pričom každá báza má dôležitú úlohu v kanonickej konvenčnej sekvencii [13], [16].

V porovnaní s inými transkripčnými faktormi, cieľové miesta väzby proteínu p53 DNA nie sú definované len konkrétnou konvenčnou sekvenciou, ale sú definované aj sekundárnou štruktúrou DNA – nešpecifickou väzbou. Dvojšrúbovica DNA sa môže stočiť do superhelixu a tým vytvárať nadzávitnicové vinutia. Naviazanie proteínov na takéto vinutia môže zvýšiť stabilitu lokálnej konformácie a/alebo vyvolať konformačné zmeny, ktoré vedú k vzniku rôznych alternatívnych štruktúr DNA. Z týchto štruktúr sú najlepšie popísané krížové štruktúry, ľavotočivá DNA (Z-DNA), triplexy, kvadruplexy a T-slučka (Obrázok 2.). Tieto miestne štruktúry DNA sa bežne vyskytujú v genómoch všetkých organizmov. Proteín p53 ich rozpoznáva hlavne C-koncovou doménou a následne sa k nim viaže s vysokou afinitou [17]–[19].



Obrázok 2: Schéma miestnych DNA štruktúr: A. krížová štruktúra, B. triplex, C. kvadruplex, D. slučka – T [11].

### 2.1.2 Mutácie proteínu p53

Divoký typ p53 (wtp53) je dobre známym nádorovým supresorom a je kriticky dôležitý pre normálny rast a vývoj buniek. Mutácie alebo funkčné inaktívácie génu *TP53* sú častým javom v nádorových bunkách, kde prispievajú k premene, metastázovaniu a k vzniku rezistencie voči liečbe nádoru. V ľudských nádoroch je väčšina mutácií génu kódujúceho proteín p53 spôsobená zámenou („missense“ mutáciou), jedinou nukleotidovou substitúciou prevažne v DNA väzbovej doméne (centrálnej doméne). Bodová mutácia môže zmeniť „zmysel“ kodónu, čím dôjde k zmene aminokyseliny v molekule proteínu a tým aj k zmene funkcie takto exprimovaného proteínu [20].

Podľa toho aká aminokyselina je substituovaná, mutantné p53 sa delia do dvoch skupín. Následkom kontaktných mutácií vzniká proteín s narušenou schopnosťou špecifickej väzby na DNA. Štruktúrne mutácie postihujú aminokyseliny, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri stabilizácii štruktúry proteínu. V oboch prípadoch je narušená schopnosť proteínu viazať sa na DNA a transaktivovať cieľové gény. Pri štúdiu mutácií bolo lokalizovaných niekoľko pozícií, kde sa mutácia vyskytuje frekventovanejšie ako na iných miestach. Tieto miesta sa nazývajú rizikovými miestami („hot spots“) a proteín p53 má 6 takýchto miest – aminokyseliny v mieste 175, 245, 248, 249, 273 a 282. Proteíny s mutáciou v týchto miestach majú obvykle vyššiu stabilitu (dlhší polčas rozpadu) a v nádorových bunkách sú prítomné vo vysokých koncentráciách [5], [21].

Vo všeobecnosti sa dajú zhrnúť efekty mutácií proteínu p53 do dvoch kategórií. Mutácie, ktoré spôsobujú stratu funkcie proteínu („loss of function“ – LOF – strata schopnosti väzby na DNA) a mutácie, ktoré zapríčiňujú získanie nových biologických a biochemických vlastností („gain of function“ – GOF). Nové získané vlastnosti väčšinou prispievajú k onkogénemu potenciálu proteínu tým, že podporujú rozvoj nádoru a rezistenciu k liečbe. Okrem toho zmutovaný proteín p53 negatívne pôsobí pri heterooligomerizácii aj na ostatné proteíny rodiny p53 (p63, p73) a zamedzuje ich naviazaniu na cieľové sekvencie. Medzi mechanizmy GOF možno zaradiť tiež narušenie spätnoväzbovej regulačnej slučky, ktoré vedie k predĺženiu polčasu rozpadu mutantov proteínu p53 a zároveň k zvýhodneniu oproti divokého typu p53 [18], [22].

Sú tiež známe prípady, keď sa funkcia p53 stratí z dôvodu interakcie s iným proteínom alebo moduláciou signálnych dráh súvisiacich s p53. Príkladom môžu byť interakcie s proteínmi niektorých DNA vírusov, ktoré špecificky viažu a inaktivujú proteín p53. U niektorých nádorov bola tiež sledovaná zvýšená hladina proteínu MDM2, ktorá funguje ako ubikvitín ligáza a umožňuje ubikvitináciu a následnú degradáciu p53 [23]. V týchto prípadoch sa využívajú malé peptidové molekuly, ktoré dokážu uvoľniť väzbu proteínu MDM2 a reaktivovať funkciu wtp53 [24].

Vo všeobecnosti však platí, že hlavnou príčinou všetkých mutácií je oxidačný stres, ktorý môže byť vyvolaný žiarením alebo rôznymi toxickými molekulami z prostredia či stravy. Ionizujúce žiarenie je schopné narušiť vodíkové väzby medzi nukleovými kyselinami a zmeniť ich chemickú konformáciu, čo môže spôsobiť zmeny v regulácii normálnej expresie DNA. Pokiaľ ide o reaktívne formy kyslíka, ako napríklad peroxid vodíku alebo hydroxylový radikál, ktoré sú normálnymi metabolickými produktmi, je popísané, že spôsobujú poškodenie a zmeny bunkových membrán, lipidov alebo DNA [21], [25], [26].

### 2.1.3 Regulácia a aktivita proteínu p53 v bunkách

Proteín p53 sa tiež nazýva „bunkovým strážcom“ alebo „strážcom genómu“ kvôli svojej ústrednej úlohe v koordinácii bunkových reakcií na širokú škálu bunkových stresových faktorov. Ak je bunka vystavená určitým typom stresu, vedie to k akumulácii a aktivácii proteínu p53. Následná p53-riadená transaktivácia cieľových génov je podstatnou črtou každej dráhy stresovej reakcie. Aktivita proteínu p53 je závislá na veľkom počte signálnych dráh, ktoré reagujú na zmeny bunkovej homeostázy alebo mikroprostredia a vedú k modulácii hladiny proteínu p53, k zmene potenciálu proteín - proteín interakcií a väzbovej afinity, resp. špecifickosti k DNA. K modulácii signálnych dráh p53 dochádza hlavne prostredníctvom posttranslačných modifikácií samotného proteínu p53 [27]. Ako transkripčný faktor, ktorý aktivuje a potláča širokú škálu cieľových génov, vyžaduje p53 mimoriadne zložitú sieť na kontrolu a „doladenie“ reakcií na rôzne stresové signály, s ktorými sa bunky stretávajú [3], [28].

Hlavným regulačným mechanizmom proteínu p53 je jeho posttranslačná modifikácia, ako počas normálnej homeostázy, tak aj pri reakciách vyvolaných stresom. Práve pri stresových podmienkach sa počet posttranslačných modifikácií zvýši, a tým sa niekoľkonásobne zvýši aj polčas rozpadu proteínu p53. Zvýšením polčasu rozpadu sa zvýši aj koncentrácia proteínu v bunkách, a tým sa zvýši aj veľkosť jeho transaktivačného potenciálu. Ukázalo sa, že až skoro 40 aminokyselín je modifikovaných prostredníctvom fosforylácie, ubikvitinácie či acetylácie. Podmienkou väzby proteínu p53 na DNA ako transkripčný faktor je jeho stabilizácia pomocou fosforylácie, ktorá je zabezpečená pomocou rôznych kináz. Stabilizácia proteínu pomocou fosforylácie je teda kľúčová pre správnu funkciu p53 [29].

Samotný proteín p53 má veľmi krátku životnosť kvôli veľkému množstvu negatívnych regulačných dráh, ako napríklad vyššie zmienený proteín MDM2. Nadmerné a neregulované množstvo proteínu p53 by mohlo mať negatívne účinky a preto je jeho regulácia nevyhnutná. Biosyntéza proteínu MDM2 je regulovaná spätnoväzobne pomocou hladiny p53, so zvyšujúcou koncentráciou p53 sa zvýši aj hladina MDM2, ktorá má za úlohu degradovať p53. Štruktúrnym homológom MDM2 je proteín MDM4, ktorý však nedegraduje p53, ale pôsobí na jeho transaktivačný potenciál [23], [30], [31].

## 2.2 Možné terapeutické prístupy

Jednou z veľkých ťažkostí pri liečbe rakoviny je špecifická likvidácia rakovinových buniek pri súčasnom chránení zdravých buniek. V dnešnej dobe najrozšírenejším prístupom liečenia nádorových ochorení je použitie rádioterapie, operácii či chemoterapie, presnejšie cytostatík. Jedná sa o látky, ktoré majú toxický charakter, priamo zastavujú rast a množenie buniek. Cytostatiká sú nešpecifické a poškodzujú bunky v rôznych fázach bunkového cyklu, hlavne počas mitózy. Na bunky, ktoré sa delia pomalšie tým pádom nemajú veľký vplyv, avšak existujú aj tkanivá, kde majú bunky fyziologicky zvýšenú replikačnú frekvenciu a dochádza tak k vedľajším účinkom liečby. Tým sú tráviace poruchy, zníženie imunity, vypadávanie vlasov, zníženie tvorby erytrocytov, trombocytov a granulocytov [6].

Reaktivácia funkcií divokého typu v zmutovaných p53, najmä indukcia apoptózy, poskytuje atraktívnu terapeutickú stratégiu na prekonanie týchto ťažkostí. Za posledných 15 rokov bolo zameraných množstvo štúdií na vývoj prostriedkov na obnovenie funkcie p53 divokého typu v bunkách. Pri mutáciách dochádza k zníženiu stability proteínu p53, ktorú ale je možné stabilizovať pomocou rôznych ligandov. Avšak nie všetky mutanty môžu byť stabilizované na úroveň wtp53 a nie všetky mutanty s obnovenou funkciou vykazujú transkripčnú aktivitu [32]. Bolo identifikovaných niekoľko syntetických polypeptidov a malých molekúl, ktoré by mohli mať schopnosť obnoviť funkcie divokého typu u mutantov p53. Medzi tieto látky patria PRIMA-1 a CDB3, avšak ich presné mechanizmy ešte stále nie sú vysvetlené [5], [33], [34].

Ďalšou možnosťou je včasná detekcia mutantných proteínov p53. Príkladom je mutant p53-R249S, ktorý sa tvorí pôsobením aflatoxínov. Tento mutant je možné detekovať prostredníctvom krvného testu založeného na plazmatickej DNA. Avšak aj v tomto obore je potrebné spraviť pokrok s cieľom posúdiť ako, a v akom kontexte môže byť mutant ako biomarker použiteľný. Jednak by sa mohol použiť na monitorovanie prebiehajúcej expozície aflatoxínu alebo by sa mohol použiť na včasné zistenie rakoviny pečene [35].

## 2.2.1 Chemoterapeutiká

Chemoterapeutiká sú látky produkované synteticky a využívajú sa najčastejšie ako liečivá. Do tejto skupiny látok patria napr. antibiotiká, antipyretika, virostatika, či cytostatiká. Pri bakteriálnych a parazitárnych infekciách sa najčastejšie využívajú sulfonamidy, ktoré zabraňujú syntéze kyseliny listovej, ktorá je nevyhnutná pre rast mikroorganizmov, a tým prispieva k zastaveniu rastu buniek. Medzi ďalšie účinné látky, ktoré sa prevažne používajú proti gram-negatívnym baktériám, patria inhibítory gyrázy. Enzým gyráza je nevyhnutná pri replikácii DNA, pri ktorej zabezpečuje jej rozvinutie a následné zavínutie. Deriváty chinolínu – fluochinolony, kyselina nalidixová a kyselina oxolinová inhibujú tento enzým a zabraňujú vytvoreniu a udržaniu správnej priestorovej štruktúry DNA. Ďalšími významnými chemoterapeutickými látkami s antibakteriálnymi vlastnosťami sú nitrofurany, sulfasaliziny, chlorchinoliny, či fluorochinolóny [36], [37].

Pod pojmom chemoterapia sa historicky myslí liečba nádorových ochorení pomocou cytostatík. Cytostatiká môžeme rozdeliť podľa pôsobenia na bunkový cyklus:

- a) *fázovo špecifické* – zasahujú a inhibujú danú fázu v bunkovom cykle (vinka alkaloidy, hydroxyurea 5-fluorouracyl ...),
- b) *cyklus špecifické* – pôsobia počas všetkých fáz cyklu – fázovo nešpecifické (alkylačné činidlá, doxorubicín),
- c) *cyklus nešpecifické* – nezávislé na bunkovom cykle a proliferáčnej aktivite (bleomycín, deriváty nitrózurei).

Cytostatiká môžu pôsobiť rôznym mechanizmom účinku, môžu inhibovať syntézu nukleových kyselín, poškodiť štruktúru nukleových kyselín alebo mikrotubulárnych proteínov slúžiacich na správne delenie buniek, alebo môžu inhibovať proteosyntézu či poškodiť bunkové membrány. Ako prvé cytostatiká sa začali používať alkylujúce látky ako napríklad oxazafosforiny, chlorambucil,  $\beta$ -chlorethylaminy, ethyleniminy, deriváty nitrosomočoviny a ďalšie. Mechanizmus účinku spočíva v prenose a naviazaní alkylového zvyšku na molekulu DNA, vďaka čomu dochádza k inhibícií jej funkcie prenášať genetickú informáciu.

Cytostatiká, ktoré blokujú syntézu (doxorubicín) alebo priamo nahrádzajú prekursor nukleových kyselín, sa nazývajú antimetabolyty. Ich delenie súvisí so štruktúrou, na základe ktorej sú zabudované do molekúl DNA alebo inhibujú syntetické procesy daných prekursorov. Analógy kyseliny listovej (raltitrexed, methotrexat) inhibujú syntézu nukleových kyselín. Analógy purínu (6-merkaptopurin, kladribin) inhibujú biosyntézu purínových báz. Pre inhibíciu pyrimidových báz sa používajú analógy pyrimidínu (cytarabin, 5-fluorouracyl).

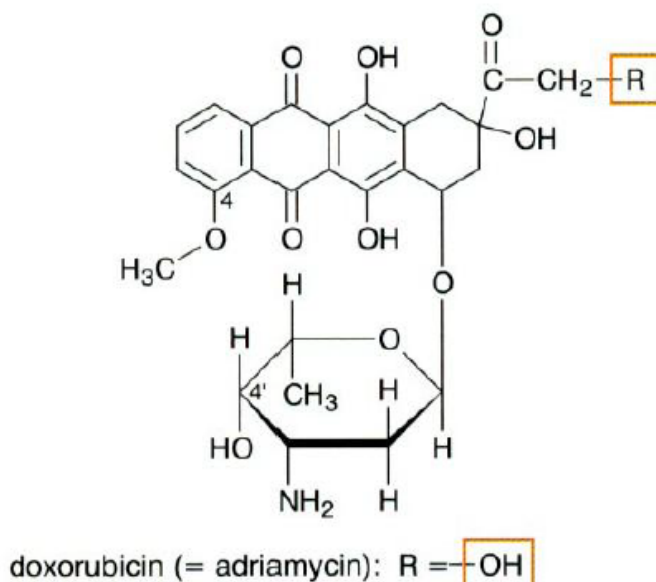
Dnes sa čoraz častejšie využívajú prírodné cytostatiká, ktoré sú väčšinou rastlinného pôvodu. Sú to najčastejšie alkaloidy, ktoré poškodzujú cytoskelet, konkrétne bunkové mikrotubuly, čím bránia správne rozdeleniu buniek. Najznámejšie alkaloidy s cytostatickými účinkami sú získavané z katarantu ružového (*Vinca rosea*).

Štruktúrne odlišnými látkami sú protinádorové antibiotiká, ktoré boli získané z rôznych druhov *Streptomyces*. Tieto liečivá majú veľmi silný až toxický antibakteriálny účinok a preto sa častejšie používajú ako cytostatiká, než na liečenie infekcií. Medzi tieto látky zaraďujeme antracyklíny, bleomycín, mytomicín C a daktinomycín.

Medzi najmodernejšie cytostatické liečivá sa zaraďujú platínové cytostatiká, ktoré spôsobujú interkalačné väzby DNA „cross-links“. V súčasnej dobe sa v klinickej praxi používajú cisplatiny, karboplatiny a oxaloplatiny [38]–[40].

### 2.2.1.1 Doxorubicín

Doxorubicín je cytostatikum s antracyklínovou základnou štruktúrou, ktorá má schopnosť interkalovať sa do jadrovej DNA. Interkalácia je nekovalentná väzba cytostatika medzi dvojšróbovicu DNA, kde sa naviaže pomocou vodíkových mostíkov. Vďaka tejto schopnosti inhibuje funkciu topoizomerázy II a tým zastavuje replikáciu DNA, transkripciu a tým i syntézu RNA závislej na DNA. Z chemického hľadiska sa jedná o 3-hydroxyacetyldaunorubicin hydrochlorid (Obrázok 3), ktorý je izolovaný zo *Streptomyces peucetius*. Pôvodne sa doxorubicín využíval ako antibiotikum voči gram-negatívnym baktériám, dnes sa využíva hlavne ako cytostatikum pri liečení rakovinových ochorení. Okrem interkalačných účinkov, redukciou doxorubicínu vznikajú kyslíkové radikály, ktoré poškadzujú rôzne intracelulárne štruktúry, hlavne mitochondrie a endoplazmatické retikulá. Pri terapeutickom použití u človeka tieto radikály tiež poškadzujú myokard skrz peroxidáciu lipidov, nakoľko myokard obsahuje málo antioxidantných enzýmov. Štúdie ukázali, že doxorubicín je účinný počas celého bunkového cyklu hlavne u rýchlo proliferujúcich tkanivách, napríklad nádorové tkanivo, ale aj kostná dreň, gastrointestinálne sliznice či vlasové bunky, a preto má typické vedľajšie účinky [41], [42].



Obrázok 3: Štruktúrny vzorec doxorubicínu [41].

### 2.2.2 Polyfenolické látky s možnými terapeutickými účinkami

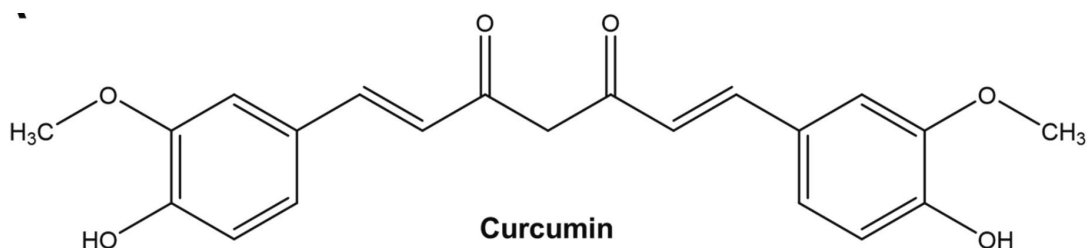
V rakovinových bunkách sa bežne vyskytuje abnormálna regulácia bunkového cyklu a inhibícia signálnych dráh apoptózy. Pri liečbe rakoviny sa široko používa chemoterapia zameraná na rakovinové bunky s abnormálnym profilom bunkového cyklu alebo indukciou apoptózy. Väčšina chemo- a hormonálne terapeutických látok má silné vedľajšie účinky, ku ktorým prispela ich cytotoxicita. Preto je skutočne dôležité vyhľadávať alternatívne cytotoxické látky, ktoré sa zameriavajú na progresiu bunkového cyklu a indukujú apoptózu konkrétne nádorových buniek bez poškodenia normálnych buniek. Potenciál rastlín ako zdrojov protirakovinových zlúčenín je v súčasnosti dobre zaznamenaný v tradičnej medicíne aj v experimentálnych nálezoach. V niekoľkých prípadoch boli fytochemické zlúčeniny priamo použité alebo chemicky upravené na vývoj chemikálií používaných v modernej medicíne vrátane protirakovinových liekov [43], [44].

Jedna zo skupín prírodných látok s možnými terapeutickými účinkami sú polyfenolické látky, ktoré disponujú veľkou škálou biologických účinkov, ako antibakteriálne, antivirotické, analgetické, antialergénne, cytostatické, apoptotické, estrogénové a mnohé ďalšie. Vďaka svojim účinkom sú intenzívne študované ako terapeutické látky proti nádorovým ochoreniam ako alternatívy k cytostatikám. Je známych niekoľko mechanizmov, ktorými prírodné polyfenolické látky ovplyvňujú rast nádorov, z ktorých najvýznamnejšie sú modulácie aktivity onkogénov a nádorových supresorov. Okrem toho majú podobné vlastnosti ako proteín p53, teda môžu zastaviť bunkový cyklus a navodiť apoptózu buniek. Medzi najvýznamnejšie induktory apoptózy polyfenolickej povahy patria epikatechíny, genistein, resveratrol či kurkumín [7], [9], [45].

U týchto látok je však problematická takzvaná biologická dostupnosť, ktorá definuje množstvo strávených, absorbovaných a metabolizovaných živín normálnymi biochemickými cestami. Metabolická aktivita polyfenolických látok závisí od vnútornej aktivity, relatívnej absorpcie z čreva, rýchlosti metabolizmu a eliminácie. Väčšina polyfenolov je v potravinách prítomná vo forme esterov, glykozidov alebo polymérov a metabolizuje sa bežnou cestou. Pred absorpciou musí byť polyfenolická látka hydrolyzovaná tráviacimi enzýmami alebo črevnou mikrobiotou prítomnou v hrubom čreve. Následne počas absorpcie prechádzajú polyfenoly rozsiahlou modifikáciou vďaka konjugáciám v črevných bunkách a ďalším spracovaním v pečeni metyláciou, sulfatáciou či glukuronidáciou. Preto sa ich formy zistené v krvi a tkanivách líšia od tých, ktoré sú prítomné v potravinách. Navyše, biologicky najaktívnejšie polyfenoly nie sú nevyhnutne najbežnejšími v strave. Porozumenie biologickej dostupnosti polyfenolov je teda dôležité pre určenie ich účinkov na zdravie. Jedným z možných riešení je vhodná kombinácia niekoľkých polyfenolov alebo kombinácie polyfenolov s inými prírodnými látkami zamerané na definované biologické ciele. Správne kombinácie mikroživín navyše umožňujú použitie nižších dávok jednotlivých zložiek bez toho, aby sa znížila ich účinnosť. Tento nový prístup otvára možnosť vyvinúť účinnejšie stratégie proti rôznym ľudským chorobám vrátane rakoviny [8], [46].

### 2.2.2.1 Kurkumín

Kurkumín je žltó-oranžový vo vode nerozpustný prášok produkovaný rastlinou Kurkuma dlhá (*Curcuma longa*), ktorá rastie prevažne v južnej časti Ázie. V nastrúhanej podobe sa často využíva v gastronómii ako žlté páľivé korenie s názvom „kurkuma“ s obsahom 77 % kurkumínu. Okrem toho sa kurkuma často využíva ako farbiaca látka v potravinárstve a v textilnom priemysle. Samotná molekula kurkumínu má hmotnosť 368,37 Da a obsahuje dva aromatické kruhy s dvoma hydroxylovými a dvoma methoxylovými skupinami spojené  $\alpha$ ,  $\beta$ -nenasýtenými karbonylovými skupinami (Obrázok 4) [47], [48].

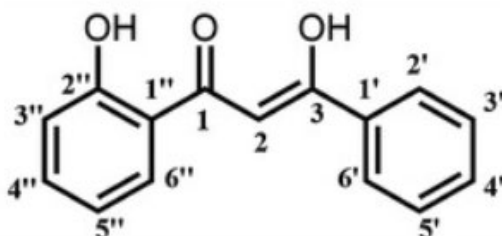


Obrázok 4: Chemická štruktúra kurkumínu [47].

Kurkumín sa dlhodobo používa ako prírodný liek pri liečbe mnohých chorôb. Niekoľko klinických testov ukázalo, že kurkumín má pri nízkych koncentráciách potenciálne terapeutické a preventívne účinky voči kardiovaskulárnym ochoreniam, rôznym druhom rakoviny, zápalom či cukrovke. Tiež účinne znižuje cholesterol v krvi, inhibuje trombózu a využíva sa ako zložka liekov proti kašli či anorexií. Napriek tomu má kurkumín kvôli svojej nízkej rozpustnosti vo vode zlú biologickú dostupnosť a jeho klinická účinnosť je značne obmedzená. Za posledných niekoľko rokov problémy s biologickou dostupnosťou súviseli so zlou absorpciou, distribúciou, metabolizmom a vylučovaním kurkumínu v sérových hladinách a jeho použitie bolo obmedzené. Tieto problémy môžu čiastočne vyriešiť chemicky syntetizované deriváty kurkumínu [49].

Schopnosť kurkumínu indukovať apoptózu v rakovinových bunkách prispieva k pochopeniu jeho protirakovinového potenciálu. Kurkumín spôsobuje zvýšenú hladinu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a peroxidáciu lipidov, čo napomáha k navodeniu programovanej bunecnej smrti. Táto apoptóza je sprostredkovaná mitochondriami pomocou aktivácie kaspáz (cysteínové proteázy). Štúdie ukázali, že apoptotické účinky prírodného kurkumínu nesúvisia so zvýšením hladiny proteínu p53 divokého typu (Wtp53), avšak pri použití chemicky syntetizovaného derivátu kurkumínu DK1 ((Z)-3-hydroxy-1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-on – (Obrázok 5) bolo zistené významné navýšenie hladiny p53 už po 24 hodinovom ošetrení [43], [50].

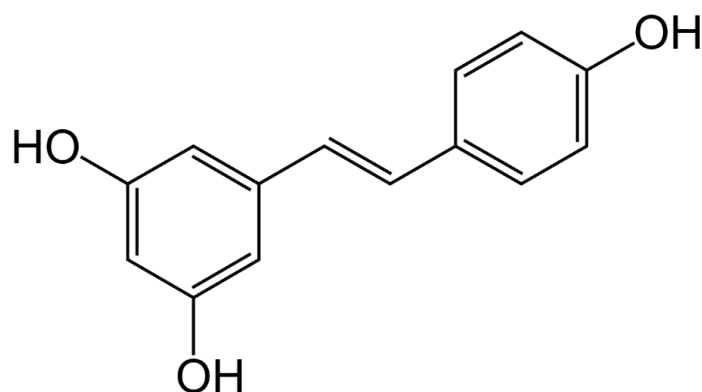
Je však potrebné poznamenať, že dlhodobé užívanie vysokých dávok kurkumínu môže pôsobiť nepriaznivo na zdravie a môže vyvolať aj poškodenie DNA a s tým súvisiace mutácie. Navyše niekoľko štúdií [51] preukázalo, že vysoká koncentrácia kurkumínu môže inhibovať apoptózu indukovanú chemoterapeutikami [51]–[54].



Obrázok 5: Chemicky syntetizovaný derivát kurkumínu DK1 ((Z)-3-hydroxy-1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-on [43].

#### 2.2.2.2 Resveratrol

Ďalšou látkou s možnými terapeutickými účinkami patriace medzi polyfenoly je resveratrol. Jedná sa o derivát stilbenu produkovaný u vyšších rastlín (vinná réva, olejnice, borovice) ako odpoveď na stres alebo infekciu. Resveratrol sa vyskytuje v červenom víne, a to v koncentráciách od 0,2 až 15 mg/l v závislosti na odrode. Základnú štruktúru tvorí *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben) (Obrázok 6), ktorého následnou izomerizáciou môže vznikať menej stabilný *cis*-izomér. Vďaka hydroxylovým skupinám má resveratrol vysoké antioxidačné účinky, nakoľko hydroxylové skupiny vykazujú afinitu k nepárovým elektrónom radikálu a tým znižujú ich reaktivitu. Predpokladá sa, že resveratrol môže pozitívne vplyvať na spomalenie starnutia, práve preto sa čoraz častejšie využíva ako potravinový doplnok [55], [56].



Obrázok 6: Chemická štruktúra trans-resveratrolu [55].

Resveratrol z rôznych zdrojov, vrátane hrozna, čučoriedok, brusníc, moruše a arašidov, je aktívne študovaný ako potenciálny terapeutický liek. Resveratrol má širokú škálu biologických účinkov vrátane antioxidačných, protizápalových, protirakovinových a antidiabetických. Je pravdepodobné, že resveratrol pôsobí inhibične v troch hlavných štádiách karcinogenézy, a to počas iniciácie, propagácie a progresie nádoru. Molekulárne mechanizmy, ktoré prispievajú k protirakovinovej aktivite resveratrolu, však nie sú úplne pochopené. Ukázalo sa, že inhibícia rastu vyvolaná resveratrolom je spojená hlavne so zastavením bunkového cyklu a indukciou apoptotickej smrti v rakovinových bunkových líniách rôzneho pôvodu. Štúdie preukázali, že resveratrol indukuje apoptózu závislú na p53 v ľudských rakovinových bunkových líniách [57]–[59].

### 2.2.2.3 Extrakty zo zeleného čaju

Extrakt zo zeleného čaju, bohatý na katechíny, bol podrobený mnohým štúdiám a ukázalo sa, že patrí medzi látky modulujúce rast rakovinových buniek [60], [61]. Katechíny patria medzi flavonoidy, čo je široká skupina polyfenolových zlúčenín, ktoré rastliny produkujú ako produkty svojho sekundárneho metabolizmu. Katechíny a epikatechíny sú látky odvodené od flavan-3-olu s vysokými antioxidačnými vlastnosťami. Rovnako ako jednoduché monoméry, aj flavan-3-oly sa nachádzajú v ovocí, v kôrach, listoch a semenách mnohých rastlín a v iných potravinách, ako sú orechy, fazuľa, obilniny, korenie, kari a škorica, v kakau a v niektorých tmavých čokoládach. Kvôli ich vysokej koncentrácii v zelenom čaji sa niekedy tieto látky nazývajú extraktom zo zeleného čaju. Medzi ich úlohy v rastlinách patrí ochrana pred rôznymi stresovými faktormi (napr. ultrafialové svetlo, toxíny alebo oxidačný stres); prenos signálu; modulácia farby a arómy kvetov a ovocia; a interakcia s okolitými rastlinami, zvieratami a mikroorganizmami [62]

Početné štúdie z posledných dvoch desaťročí zistili, že vysoký príjem flavan-3-olov, vrátane epikatechínu, môže poskytovať ochranu pred kardiovaskulárnymi ochoreniami a metabolickými poruchami. Okrem toho polyfenoly zo stravy môžu ovplyvňovať a modulovať rôzne biochemické procesy a cesty zúčastňujúce sa karcinogenézy [8], [62]. Ukázalo sa, že tri katechínové estery tvorené kyselinou gallovou (epikatechín-3-galát (ECG), epigalokatechín (EGC) a epigalokatechín-3-galát (EGCG)) majú protirakovinovú preventívnu aktivitu, a že ich kombinácia má synergický účinok na rakovinové bunky vyvolaním apoptózy a inhibíciou proliferácie. Pri týchto štúdiách bol zistený aj signifikantný nárast apoptotických proteínov, medzi ktorými bol aj proteín p53 [7], [63], [64].



#### 2.2.2.4 Extrakty z kapustovitých rastlín a kvercetín

Kapustovité zeleniny, ako je brokolica, kapusta či karfiol, obsahujú množstvo výživných látok a fytochemikálií s preventívnymi vlastnosťami proti rakovine, vrátane karotenoidov, chlorofylu a vlákniny. Ich jedinečná protirakovinová vlastnosť súvisí s vysokým obsahom prírodných zlúčenín obsahujúcich síru známych ako glukozinoláty, ktoré po hydrolýze tvoria bioaktívne izotiokyanáty. Ukázalo sa, že tieto bioaktívne zložky môžu uľahčiť detoxikáciu a vylučovanie karcinogénov, chrániť pred oxidačným stresom, inhibovať množenie rakovinových buniek a zvyšovať apoptózu, čo vedie k inhibícii rastu nádoru [65].

Kvercetín je rastlinný flavonol patriaci do skupiny polyfenolov. Nachádza sa v mnohých druhoch ovocia, zeleniny, listov, semien a obilnín. Červená cibuľa a kel sú bežné potraviny obsahujúce značné množstvo kvercetínu. Kvercetín má horkú príchuť a používa sa ako prísada do doplnkov výživy, nápojov a jedál. Medzi preventívne účinky kvercetínu voči rakovine patrí indukcia zastavenia bunkového cyklu, apoptóza a antioxidačné funkcia. Indukcia apoptózy kvercetínom v rakovinových bunkách počas rôznych fáz bunkového cyklu bez ovplyvnenia normálnych buniek bola dokumentovaná u rôznych druhov rakoviny *in vivo* a *in vitro*. Uvádza sa, že kvercetín znižuje riziko a progresiu rakoviny prostredníctvom aktivity zachytávania voľných radikálov. Štúdia [66] tiež ukázala, že injekcia kvercetínu priamo do nádorov prsníka viedla k významnému zníženiu ich hmotnosti. Štúdie [67] tiež preukázali, že kvercetín môže zosilniť účinnosť súbežne podávaných liekov zvýšením ich biologickej dostupnosti a akumulácie a senzibilizáciou rakovinových buniek na tieto chemoterapeutiká [68].

### 2.3 Metódy testovania viability po pôsobení chemoterapeutík a prírodných toxínov

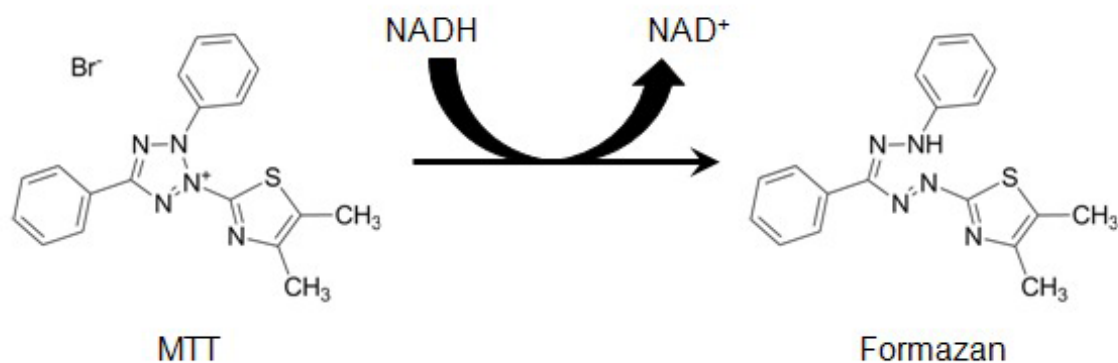
Testy viability určujú schopnosť orgánu, tkanív či buniek udržať alebo obnoviť životaschopnosť. Sledovanie viability *in vitro* sa obširne používa v biomedicínskom výskume a vo vývoji liečiv na určovanie toxicity látok alebo účinkov látok na zmiernenie účinkov toxických látok. Často sa táto technika využíva pre zistenie účinnosti kryokonzervácie alebo úspešnosti transformačných techník. Životaschopnosť možno pozorovať prostredníctvom fyzikálnych vlastností buniek, tkanív či orgánov. Niektoré z nich zahŕňajú mechanickú aktivitu, pohyblivosť, ako napríklad u spermií a granulocytov, kontrakciu svalového tkaniva alebo buniek, mitotickú aktivitu a mnohé ďalšie [69].

#### 2.3.1 Spektroskopické testy viability

Tieto testy vyžadujú inkubáciu činidla s populáciou životaschopných buniek, kde prebieha premena substrátu na farebný alebo fluorescenčný produkt, ktorý je možné detekovať spektroskopicky. Za väčšiny štandardných kultivačných podmienok bude mať inkubácia substrátu so životaschopnými bunkami za následok generovanie signálu, ktorý je úmerný počtu prítomných životaschopných buniek. Akonáhle bunky odumrú, rýchlo strácajú schopnosť premieňať substrát na produkt. Tento rozdiel predstavuje základ pre mnoho bežne používaných testov životaschopnosti buniek.

Medzi testy životaschopnosti, ktoré sú založené na premene substrátu na chromogénny produkt živými bunkami, je najrozšírenejší a najuniverzálnejší test MTT. MTT je vo vode rozpustná žltá zlúčenina (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), ktorá sa vplyvom mitochondriálnych reductáz premieňa na modro-fialový kryštalický formazán

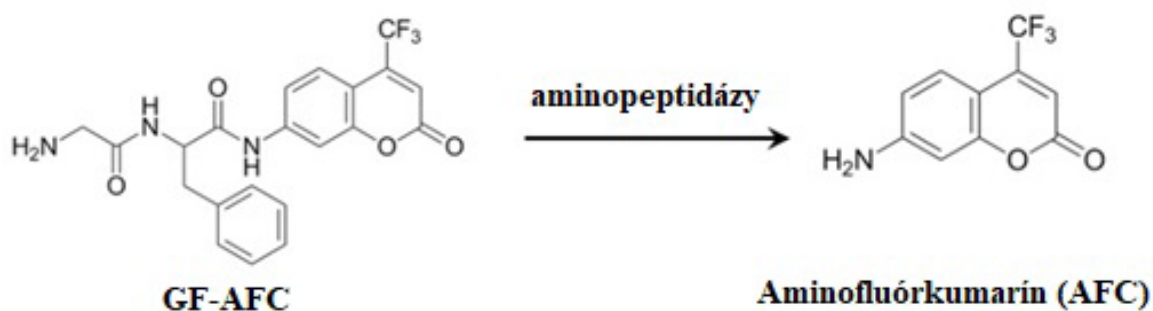
(Obrázok 7). Formazán sa následne rozpúšťa a koncentrácia sa stanovuje spektroskopicky pri vlnovej dĺžke 570 nm. Výsledkom je citlivý test s vynikajúcou linearitou až do  $10^6$  buniek na jamku. I malé zmeny v metabolickej aktivite buniek môžu generovať veľké rozdiely v koncentrácii formazánu, čo umožňuje detekovať aj bunkový stres po vystavení toxickému činidlu bez priamej bunkovej smrti [70], [71].



Obrázok 7: Štruktúra substrátu MTT a produktu formazánu [71].

Medzi ďalšie spektroskopické testy životaschopnosti patria testy redukcie resazurínu, ktoré sú veľmi podobné testom na tetrazólium, až na to, že využívajú redoxnú energiu. Na stanovenie počtu životaschopných buniek prítomných v bunkovej suspenzii sa používa test vylúčenia farbiva z bunky. Platí, že ak živé bunky obsahujú neporušené bunkové membrány, ktoré vylučujú určité farbivá, ako je trypanová modrá, eoín alebo propídium, tak mŕtve bunky nemajú túto schopnosť. V tomto teste sa bunková suspenzia jednoducho premieša s farbivom a následne sa vizuálne skúma, či bunky absorbujú alebo vylučujú farbivo [72].

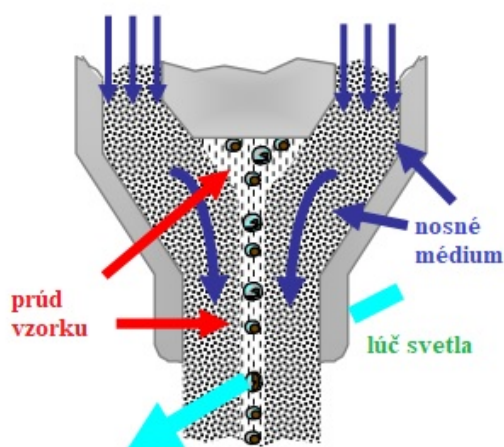
Ďalšou technikou, ktorá je založená na spektroskopickom meraní je meranie aktivity proteáz. Ukázalo sa, že meranie konzervatívnej a konštitutívnej aktivity proteáz v živých bunkách slúži ako „marker“ životaschopnosti buniek. Bunkovo priepustný fluorogénny proteázový substrát (glycylfenylalanyl-aminofluórokumarín; GF-AFC), ktorý selektívne detekuje aktivitu proteázy obmedzenú na viabilitu buniek, môže prenikať živými bunkami, pričom aktivita cytoplazmatickej aminopeptidázy odstraňuje glycín a fenylalanín za účelom uvoľnenia aminofluórokumarínu (AFC) a generovania fluorescenčného signálu úmerného počtu životaschopných buniek (Obrázok 8) [73].



Obrázok 8: Bunkovo priepustný glycylfenylalanyl-aminofluoroumarínový (GF-AFC) substrát sa premení cytoplazmatickou aminopeptidázovou aktivitou na fluorescenčný aminofluórokumarín (AFC)[73].

### 2.3.2 Sledovanie viability pomocou prietokovej cytometrie

Prietoková cytometria je náročná, napriek tomu rýchlo rozvíjajúca sa prístrojová metóda, využívaná ako v klinickej praxi, tak vo výskumných laboratóriách. Je založená na meraní pohybu buniek cez prietokovú komôrkou, do ktorej je vzorka pod tlakom nastriekaná do nosného média. Pomocou hydrodynamickej fokusácie je prúd vzorky postupne zúžený až na toľko, aby bunky prechádzali prietokovou komôrkou po jednom. Samotná analýza je prevedená pomocou lúča svetla stretávajúceho sa s bunkami (Obrázok 9). Technológia je unikátna kvôli svojej schopnosti poskytovať rýchle, kvantitatívne a multiparametrálne analýzy jednotlivých živých alebo mŕtvych buniek. Jej ďalšou výhodou je, že je možné analýzu vlastností na úrovni bunky vykonávať vo vzorke o veľkom počte buniek počas veľmi krátkeho časového úseku [74], [75].



Obrázok 9: Základná schéma prietokovej komôrky, kde prebieha analýza pomocou lúča svetla [74].

Konvenčná prietoková cytometria využíva dichroické (dvojfarebné) zrkadlá a pásmové filtre na výber špecifických pásiem optického spektra na detekciu pomocou bodových detektorov, ako sú fotonásobiče. Tento prístup bol veľmi efektívny na detekciu signálu zo špecifických fluoroforov, ale vzorkovanie optického spektra s nízkym rozlíšením obmedzuje jeho užitočnosť pre zložitejšie optické analýzy. Postupne sa vyvíjali nové techniky založené na spektrofotometrii, ktoré sú schopné zhromaždiť kontinuálne optické spektrum s vysokým rozlíšením z jednotlivých častíc. Posledné pokroky v optike a detektoroch umožnili uskutočňovať úplné spektrálne merania v časových škálach pod milisekundu, v ktorých sa obvykle vyskytujú merania prietokovou cytometriou. Na tom je založená spektrálna prietoková cytometria, ktorá obsahuje namiesto klasických optických filtrov a zrkadiel spektrograf. Jedná sa o prístroj, ktorý rozdeľuje svetlo na frekvenčné spektrum a zaznamenáva signál pomocou fotoaparátu. Moderná spektrálna prietoková cytometria predstavuje niekoľko možností nastavenia a analýzy dát, ktorých výber je nakoniec určený potrebami biologických aplikácií. Vo všeobecnosti však pomocou tejto techniky je možné detegovať signál s vysokým rozlíšením rýchlejšie ako u konvenčných techník [76].

FACS („Fluorescent Activated Cell Sorting“) je špecializovaný typ prietokovej cytometrie. Poskytuje spôsob na triedenie jednotlivých buniek heterogénnej zmesi biologických buniek do dvoch alebo viacerých nádob, na základe špecifického rozptylu svetla a fluorescenčných vlastností každej bunky. Rozlíšenie medzi apoptickými a nekrotickými bunkami sa vykonáva pomocou duálneho farbenia, a to Annexinom V a propidium jodidom (PI). Zdravé bunky s hydrofóbnou povahou exprimujú na svojej vnútornej membráne fosfatidylserín. Pri prechode

apoptózou dochádza k obráteniu membrán, čím sa na povrch dostáva fosfatidylserín. Ten je detekovaný annexínom V a PI zafarbí nekrotické bunky, ktorých povrch je poškodený [77].

## 2.4 Modelové systémy na testovanie vplyvu polyfenolických látok

### 2.4.1 Tkaninové kultúry MCF-7

Bunkové a tkanivové kultúry dnes patria medzi najpoužívanějších biologické modely používané vo výskume. Bunková kultúra sa zakladá izoláciou určitého typu buniek zo zvierat, človeka či rastliny – tzv. „primokultúra“. K izolácii sa najčastejšie používajú techniky založené na mechanickom rozrušení buniek a následnom enzymatickom natrávení. Bunky sa kultivujú najčastejšie na priľnavých hydrofóbných povrchoch, ale je možná i submerzná kultivácia v suspenzii. Pri adhézne kultivácii bunky rastú exponenciálne do momentu, kým sa nezačnú navzájom dotýkať, ich rast sa spomalí a vytvorí sa jedna veľká vrstva buniek („monolayer“). Odlepenie od kultivačného povrchu je možné pomocou pridania proteáz, odstránením iónov, či znížením teploty. Nariedenie a nasadenie kultúry do novej kultivačnej nádoby sa nazýva pasážovanie, ktoré je možné opakovať len limitovane. Kultivačné podmienky sú najčastejšie nastavené na podmienky zhodné *in vivo*. Experimentálne sa kultivácia buniek *in vitro* používa najmä pre vývoj a testovanie nových liekov. Ako bunkové kultúry sa využívajú jednotlivé súčasti rastlinného, ľudského, alebo i zvieracieho organizmu. Kultivácia je však neoddeliteľnou súčasťou aj v klinickej praxi, napríklad pri hodnotení kvality štep pre transplantáciu kostnej drene. Služi tiež ako zdroj materiálu pre biotechnologické aplikácie napr. pri produkcii monoklonálnych protilátok [78], [79].

Pôvodná MCF-7 bunková línia karcinómu prsníka bola získaná v roku 1970 od 69-ročnej ženy, ktorá počas piatich rokov podstúpila dve mastektómie – odstránenie prsných žliaz. Dnes je bunková línia MCF-7 získavaná z rôznych zdrojov, najčastejšie od NIH (National Institutes of Health – „Národné ústavy zdravia“) či ATCC (americká zbierka typových kultúr). Porovnaním karotypov, rastových kriviek, rastu v médiu, obsahu estrogénového a progesterónového receptora a rastu nádoru, možno nájsť určité rozdiely v jednotlivých líniiach z rôznych zdrojov. MCF-7 majú tendenciu rásť v kolóniách. Môžu rásť na mäkkom agare alebo na pevných povrchoch s tekutým médiom. *In vitro* majú bunky MCF-7 nízku invazívnu schopnosť. Pre kultiváciu je najčastejšie využívané kultivačné médium s prídavkom hovädzieho séra (FBS), v mnohých prípadoch obohatené o rôzne aminokyseliny, antibiotiká a tlmivé roztoky [80], [81].

### 2.4.2 Kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*

Na preskúmanie proteínu p53 sa používa množstvo modelov, či už vyššie popísané tkaninové bunky alebo jednoduchšie eukaryotické organizmy ako kvasinky či prokaryotické baktérie. Najviac využívanou kvasinkou je *Saccharomyces cerevisiae*, ktorej názov je odvodený od latinského názvu „Saccharata“ (cukor) a „myces“ (huba). Kvasinky rodu *Saccharomyces* patria medzi jednobunkové eukaryotické mikroorganizmy (huby). Ide o jednoduchý a odolný organizmus, ktorý sa pri dostatočnom prísune potravy dokáže rýchlo rozmnožovať. Bunky sa pri delení väčšinou úplne oddeľujú, a tvorí teda po výseve na platne monoklonálne kolónie (klony vzniknuté z jedinej bunky), čo uľahčuje napr. izoláciu mutantov. Kvôli jednoduchej genetickej manipulovateľnosti a schopnosti posttranslačne modifikovať proteíny sa využíva ako modelový eukaryotický systém. [82].

### **3 Experimentálna časť**

#### **3.1 Cieľ práce**

Cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bolo:

- Literárna rešerš k vybranej téme,
- Testovanie viability buniek po pôsobení chemoterapeutík a prírodných polyfenolických látok,
- Sledovanie vplyvu prírodných polyfenolických látok na tieto bunky a na level proteínu p53,
- Sledovanie vplyvu prírodných polyfenolických látok na väzbu p53-DNA v kvasinkovom izogénnom systéme.

## 3.2 Materiály a prístroje

### 3.2.1 Chemikálie

- Agar biotechnologický (Serva)
- Ampicilín (Biotika)
- Bradfordovej činidlo (Serva)
- DMEM médium (PAA)
- DMEM médium (PAA)
- Doxorubicín (Sigma)
- Farbivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10 000x (Biotium)
- Fetálne bovinné sérum (Biosera)
- fetálne bovinne sérum (PAA)
- Glukóza (Lach:ner)
- Glycerol (Lach:ner)
- Glycín (Penta)
- HCl, 35% (LACHEMA)
- inhibitory proteáz cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (SigmaAldrich)
- KCl (Lach:ner)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lach:ner)
- Kvasinkový Extrakt (HIMEDIA)
- L-glutation, redukovaný >98% (Sigma-Aldrich)
- lyzačný pufor 1x „RIPA lysis buffer“
- Lyzozým (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Penta)
- MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich)
- MgSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, bezvodý (Lach:ner)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lach:ner)
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)
- NaCl (Lach:ner)
- Penicilín (Thermo Scientific)
- Persíran amónny (APS) (Sigma)
- Propidium iodid (Sigma)
- Proteínový rebríček Precision Plus Protein Dual Xtra Protein Standards 2–250 kDa (Bio-Rad)
- protilátka DO-1 – monoklonální myši (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- Streptomycín (Thermo Scientific)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Tris (Serva)
- Trypton (Serva)
- Základ pre kompletne kvasinkové médium (YPD broth) (Difco)
- Základné médium s dusíkom bez obsahu aminokyselín – Yeast NitrogenBase (Difco)

### 3.2.2 Ostatné materiály

- detekčný kit „supersignal West Pico“ (Thermo Scientific)
- Kmene *Sacharomyces Cerevisiae*: TT, PU21, PUMA (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- Izolačný kit E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit (OMEGA BIO-TEK)
- nitrocelulózová membrána (Pall Corporation)
- Plazmidová DNA s pAG414GAL-p53 $\alpha$  inzertom (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- Plazmidová DNA s pAG415GPD-p53 $\alpha$  inzertom (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- Plazmidová DNA s pRS314 inzertom (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- Plazmidová DNA s pRS315 inzertom (Akademie věd ČR – biofyzikální ústav)
- Polyklonálna protilátka Anti Mouse IgG – Peroxidáza produkovaná v kozách (SIGMA)

### 3.2.3 Laboratorne prístroje

- Autokláv Microjet Personal Microwave Autoclave (Enbio)
- centrifuga 5804R (Eppendorf)
- Dokumentačný systém na fotenie gélov Amersham Imager 680 (GE Helathcare)
- Elektroforetická aparátúra Mini Protean Tetra Cell System (Bio-Rad)
- ELISA reader - Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Bio Tek)
- Inkubátor 1000 (Heidolph)
- Laminárny box Aura Mini (Bioair Instruments)
- MiniSpin plus (Eppendorf)
- Prietokový cytometer SP6800 (SONY)
- Sada mikropipet (Gilson)
- Spektrofotometer Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
- Spektrofotometer (Implen)
- Termoblok Termo-Shaker TS-100C (Biosan)
- Trepačka Mini Shaker (VWR Life Science)
- Váha analytická (A&D INSTRUMENTS LTD)
- Váha stolná Scout Pro SPU 402 (Ohaus)
- Vortex Genie 2 (MoBio Laboratories)
- Zdroj napätia PowerPac 300 (Bio-Rad)

### 3.3 Metódy

#### 3.3.1 Zloženie roztokov, médií a puferov

##### 3.3.1.1 Médiá použité na kultiváciu bakteriálnych kultúr

###### LB médium

1 % tryptón, 0,5 % kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, pH 7,0, (prídavok 1,4 % agaru pre prípravu agarových misiek)

###### SOC médium

2 % tryptón, 0,5 % kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukóza.

##### 3.3.1.2 Médiá používané pri kultivácii kvasinkových kultúr

###### Kompletné tekuté neselektívne médium (YPDA)

50 g/l YPD, 200 mg/l adenín.

###### Kompletné pevné neselektívne médium (YPDA)

50 g/l YPD, 40 ml/l 0,5 % adenín, 2 % agar.

###### Syntetické leucín a tryptofán selektívne médium (ItA)

6,7 g/l základné YNB médium, 2 % dextróza, 40 ml/l 0,5 % adenín, 2 ml/l 1% histidín, 3 ml/l 3 % lyzín, 2 ml/l 1 % uracil, 2 % agar.

###### Syntetické selektívne médium (SRItA)

6,7 g/l základné YNB médium, 0,2/ 2% rafinóza, 200mg/l adenín, 20mg/l histidín, 30 mg/l lyzín, 20 mg/l uracil

##### 3.3.1.3 Médiá použité na kultiváciu tkanivových buniek

###### Kultivačné médium DMEM

DMEM High Glucose s L-glutamínom a sodium pyruátom (Biosera), ktoré obsahovalo 100 µg/ml penicilínu a 100 µg/ml streptomycínu a 10 % fetálne bovinné sérum.

##### 3.3.1.4 Roztoky

- 10 % APS: 1 g peroxodisíranu amónneho, 10 ml destilovanej vody.
- blokovací roztok – 5% sušené mlieko v 1x PBS
- Blotovacie pufer 10x, 1 l - 10 g SDS, 30,3 g Tris, 144,2 g Glycín, 100 ml metanolu, doplnenie do 1 l: Milli-Q voda
- lyzačný pufer – 1x RIPA 10x (Millipore), 1x inhibitor proteáz (Complete, Roche)
- Nanášací pufer CSB 5x - 100 mM Tris (pH 6,8), 20 % glycerol, 4 % SDS, 200 mM β-merkaptoetanol, 0,1 % bromfenolová modrá.
- PBS 10x, 1 l - 2 g KCl, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 g NaCl, doplnenie do 1 l: Milli-Q voda



- PEG+LiAc+TE (1 ml: 100  $\mu$ l 10xTE, 100  $\mu$ l 1M LiAc a 800  $\mu$ l 50% PEG)
- Rozpúšťací roztok MTT – 0,2 ml NP40, 0,8 ml 1 M HCl, doplnenie do 200 ml: 100 % isopropanol
- Elektroforetický pufer pre PAGE-SDS 10x, 1 l - 10 g SDS, 30,3 g Tris, 144,2 g Glycin, doplnenie do 1 l: Milli-Q voda
- TAE 50x, 1 l - 242 g Tris p.a., 18,6 g EDTA, 57,1 ml kyselina octová, doplnená Milli-Q H<sub>2</sub>O
- Zásobný roztok - 5% akrylamid: 12,5 ml 40% akrylamid:bisakrylamid 19:1, 12,5 ml 1 M Tris (pH 6,8), 1 ml 10% SDS, doplnenie do 100 ml: Milli-Q voda
- Zásobný roztok - 10% akrylamid: 75 ml 40% akrylamid:bisakrylamid 19:1, 112 ml 1 M Tris (pH 8,8), 3 ml 10% SDS, doplnenie do 300 ml: Milli-Q voda

### 3.4 Testy viability na bunkových líniiach MCF-7

#### 3.4.1 Príprava bunkových línii MCF-7

MCF-7 je nádorová línia adenokarcinómu prsníka. Bunky sú epiteliálne, nárast tvorí na pevnom povrchu iba jednu vrstvu. Pre kultiváciu buniek MCF-7 bolo použité komerčne dostupné DMEM médium, do ktorého bolo pridaných 50 ml fetálneho hovädzieho séra a 5 ml 100x koncentrovanej zmesi antibiotík penicilínu a streptomycínu. Bunečné kultúry boli pripravované a inkubované v kultivačných nádobách TPP 75 cm (P-LAB) v objeme 10 ml DMEM média. Bunky v kultivačných nádobách boli inkubované v inkubátore pri 37 °C (odchýlkou 0,2°C), 5 % vlhkosťou a s 5% CO<sub>2</sub> po dobu približne 7 dní. Počas inkubácie bol optickým mikroskopom kontrolovaný stav buniek.

#### 3.4.2 Testy viability MTT

Testovanie viability sa skladá zo štyroch po sebe nasledujúcich dňoch, pričom celý postup bol uskutočnený v UV sterilnom „flow boxe“ a všetky inkubácie prebiehali v inkubátore pri 37°C s 5% vlhkosťou a 5% CO<sub>2</sub>.

##### 3.4.2.1 Prvý deň

Kultivačná nádoba bola po približne siedmich dňoch vybraná z inkubátoru a pomocou optického mikroskopu bol skontrolovaný stav MCF-7 buniek. V sterilnom flowboxe bolo z nádoby odsaté médium v naklonenej polohe. Bunky boli premyté pridaním 5 ml 1x PBS, ktorý bol následne opäť odsatý. Následne boli pridané 3 ml 1x trypsínu pre uvoľnenie buniek z povrchu kultivačnej nádoby a po 5 minútovej inkubácii boli pre neutralizáciu reakcie pridané 3 ml DMEM média. Vzniknutým roztokom bolo omyté dno nádoby (pre uvoľnenie buniek z celého povrchu nádoby) a 5 ml suspenzie bolo prenesených do sterilnej ø 10 cm Petriho misky. Tá bola ponechaná 24 h v inkubátore. Nová kultivačná nádoba bola pripravená pridaním zvyšnej suspenzie do 10 ml nového média. Takto založená kultivačná nádoba s bunkovými líniami bola pripravená na ďalší týždeň.

### 3.4.2.2 Druhý deň

Po uplynutí kultivačnej doby bolo médium sterilne odsaté a bunky boli premyté 1x PBS rovnako ako v prvý deň. K bunkám bolo pridaných 1,5 ml 10 mM EDTA a po 5 minútovej inkubácii bol roztok s bunkami prenesený do 15 ml centrifugačnej skúmavky a bol centrifugovaný 5 minút pri 300 x g a 4 °C. Supernatant bol odstránený a pelet bol resuspendovaný v 5 ml nového média. Pomocou Bürkerovej komôrky boli bunky spočítané pod mikroskopom. Po spočítaní buniek bola pripravená suspenzia s koncentráciou 7 500 buniek/ml. Do každej jamky v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke bolo napipetovaných 100 µl nariedenej suspenzie a doštička bola inkubovaná ďalších 24 hodín v inkubátore.

### 3.4.2.3 Tretí deň

Po inkubácii bolo médium opatrne odsaté z bočnej strany jamiek tak, aby nebola narušená vrstva buniek prilnutá ku dnu jamiek. Následne boli podľa Tabuľky 1 nariedené použité cytostatiká (doxorubicín) a polyfenolické látky (resveratrol a kurkumín).

Tabuľka 1: Riedenie na prípravu roztokov cytostatík/polyfenolických látok.

Koncentrácia (µM)	Objem použitých zlúčenín(µl) + [koncentrácia zásobného roztoku µM]	Objem pridaného média [µl]
50	125 [200 µM]	365
30	75 [200 µM]	425
20	50 [200 µM]	450
10	25 [200 µM]	475
5	12,5 [200 µM]	487,2
1	50 [10 µM]	450
0,1	5 [10 µM]	495

Do jamiek 96-jamkovej mikrodostičky boli postupne pridané použité látky v objeme 100 µl v troch opakovaniach so zvyšujúcou sa koncentráciou v smere zhora nadol. Tretí riadok bol použitý pre kontrolu – médium s prítomnosťou buniek, médium bez prítomnosti buniek a 50 µM DMSO. Takto pripravená doštička bola ponechaná v inkubátore do druhého dňa.

### 3.4.2.4 Štvrtý deň

Na analytických váhach bolo navážených 10 mg MTT, ktoré bolo rozpustené v 2 ml 1x PBS. K tomuto roztoku bolo pridaných 10 ml média. Z jamiek mikrodostičky bolo odsaté médium a každá jamka bola premytá 100 µl 1x PBS, ktoré bolo opäť odsaté. Potom bolo do každej jamky napipetovaných 120 µl roztoku MTT a mikrodostička bola inkubovaná 3 hodiny v inkubátore. Po ukončení inkubácie bol roztok odsatý a pre rozpustenie kryštálov formazánu bolo pridaných 150 µl "MTT solution". Mikrodostička bola umiestnená na trepačku, kde bola inkubovaná v tme po dobu 15 min. Nakoniec bola meraná absorbancia v jednotlivých jamkách pri 595 nm pomocou ELISA „readeru“. Výsledky boli po spracovaní vynesené do grafu a z výsledných hodnôt boli vypočítané hodnoty LD10, LD50 a LD90.

### **3.4.3 Testovanie pôsobenia použitých látok pomocou spektrálnej prietokovej cytometrie**

Pomocou tejto metódy bol zistený stav buniek po pôsobení chemických látok na základe MTT analýzy. Bunky boli pripravené podľa postupu z kapitoly 3.4.2.1. a riedenie bolo spočítané podľa postupu 3.4.2.2. na koncentráciu 500 000 buniek na 800  $\mu$ l. Pripravené bunky boli napipetované do 6 jamkovej doštičky (P-LAB) v objeme 800  $\mu$ l a boli inkubované 24 hodín v inkubátore. Po uplynutí inkubačnej doby bolo médium odsaté a bunky boli premyté 1 ml 1x PBS. V medzičase boli pripravené roztoky resveratrolu a kurkumínu v koncentráciách odpovedajúcej LD10, LD50 a LD90 zistených z MTT analýz. Ako pozitívna kontrola bol využitý roztok peroxidu vodíku v koncentrácii 100  $\mu$ M a 250  $\mu$ M. Bunky boli inkubované 12 hodín pri rovnakých podmienkach. Následne bolo do jamiek pridaných 290  $\mu$ l 10 mM EDTA a po 5 min. inkubácií bola zmes prenesená do vopred označených 15 ml centrifugačných skúmaviek. Tie boli centrifugované 5 minút pri 1500 rpm a 4 °C. Supernatant bol odsatý a pelet bol resuspendovaný v 800  $\mu$ l 1x „assay bufferu“. Bolo odobraných 100  $\mu$ l suspenzie do skúmaviek určených pre prietokovú cytometriu a následne bolo pridaných 10  $\mu$ l PI (propidium iodid) a 1  $\mu$ l Annexinu V. Ako negatívna kontrola bola použitá bunčná línia s médiom bez pridaných látok. Do prvej negatívnej kontroly bol pridaný len annexín V, do druhej len PI a do tretej obe látky. Tieto vzorky boli použité na kalibráciu metódy pred meraním samotných vzoriek. Do merania boli vzorky ponechané v tme na ľade. Samotná analýza bola uskutočnená pomocou spektrálneho analyzátoru buniek SP6800 (SONY) a dáta boli vyhodnotené pomocou programu FCS Express 6 Flow (Research edition). Percento apoptotických buniek sa stanovilo podľa protokolu výrobcu pomocou kitu na detekciu apoptózy Annexin V: sc-4252 AK.

## **3.5 Analýza hladiny proteínu p53 v bunkových líniiach MCF-7**

### **3.5.1 Príprava lyzátu**

Pre zistenie vplyvu doxorubicínu, resveratrolu a kurkumínu na hladinu proteínu p53 v bunkovej línii MCF-7 bol použitý podobný postup ako pre analýzu viability. Bunky boli pripravené a ošetrené zmienenými látkami podľa postupu z kapitol 3.4.2.1., 3.4.2.2. a 3.4.2.3, pričom namiesto 96-jamkovej doštičky bola použitá 6-jamková doštička s výsledným objemom 2 ml (množstvo buniek bolo prepočítané na plochu jamky). Po 12 hodinovom ošetrení boli bunky prenesené do 2 ml skúmaviek značky Eppendorf a bola uskutočnená lýza buniek v 50  $\mu$ l roztoku s obsahom 1x „RIPA lysis buffer“ a 1x ppi (zmes inhibítorov proteáz) na ľade za občasného premiešania pomocou vortexu. Po 30 minútach bola zmes centrifugovaná pri 1 500 x g a supernatant s obsahom proteínov bol prenesený do novej skúmavky. Koncentrácia proteínov v lyzáte bola stanovená pomocou metódy Bradfordovej.

### **3.5.2 Stanovenie koncentrácie celkových proteínov v lyzáte pomocou Bradfordovej metódy**

Ako kalibračná rada bola použitá rada roztokov BSA („hovädzí serum albumín“ – hovädzí sérový albumín) v použitom lyzačnom pufrí (1x RIPA a 1x ppi), a to v rozmedzí koncentrácií 0 - 4,0 mg/ml. Vzorky kalibračnej rady a proteínových lyzátov boli pripravené zmiešaním 100  $\mu$ l Bradfordového činidla, 396  $\mu$ l vody a 4  $\mu$ l vzorku - roztoku BSA či proteínového lyzátu. Ako blank bol použitý samotný lyzačný pufer. Kalibračná rada a vzorky lyzátov boli nanosené v dvoch opakovaniach po 200  $\mu$ l na 96-jamkovú doštičku, ktorá bola 10 minút

inkubovaná pri laboratórnej teplote a potom umiestnená do ELISA čítačky, kde bola zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 595 nm.

### **3.5.3 Analýza proteínov pomocou SDS-PAGE elektroforézy**

#### **3.5.3.1 Príprava gélu na SDS-PAGE elektroforézu**

Pred prípravou gélu boli sklá a hrebienky dôkladne umyté saponátom a následne boli opláchnuté destilovanou vodou a vyleštené etanolom. Sklá boli zostavené k sebe a boli zaistené stojanom, ktorý bol následne vložený do pripravenej aparatury na prípravu gélu.

Spodná časť gélu bola pripravená zmiešaním 10 ml 10% akrylamidu so 45  $\mu$ l 10 % APS (persíran amónny) a 15  $\mu$ l TEMEDu. Po pridaní TEMEDu bol roztok ihneď premiešaný a naliaty medzi pripravené sklá tak, aby horný okraj gélu bol 2,5 cm od vrchného okraja skla. Gél bol potom prevrstvený butanolom pre vyrovnanie hladiny naliateho gélu a aby sa zabránilo difúzií kyslíku, ktorý by mohol potlačiť polymerizáciu. Gél bol ponechaný vo vertikálnej polohe cca 15 minút. Po stuhnutí gélu bol butanol odliaty a nadbytočné kvapky boli vysušené pomocou filtračného papiera.

Následne bola pripravená vrchná koncentračná vrstva gélu zmiešaním 3 ml 5% akrylamidu, 15  $\mu$ l 10% APS a 4,5  $\mu$ l TEMEDu. Tento roztok bol po zmiešaní okamžite naliaty medzi sklá k pripravenému separačnému gélu a do vrchnej časti bol umiestnený hrebienok. Gél bol ponechaný vo vertikálnej polohe do úplného zatuhnutia. Po stuhnutí bol gél vložený do elektroforetickej aparatury a bol zaliaty 1x elektroforetickým pufrom. Pod hladinou pufru bol odstránený hrebienok a aparatura bola pripravená na nanášanie vzoriek.

#### **3.5.3.2 Príprava a nanesenie vzoriek**

K testovaným lyzátom v objeme 40  $\mu$ l bolo pridaných 7,5  $\mu$ l 5x CSB nanášacieho pufru. Obsah skúmaviek bol dôkladne premiešaný, centrifugovaný a následne inkubovaný pri 95 °C po dobu 5 minút. Po inkubácii boli vzorky premiešané vortexovaním a do jamiek nanesené v objeme 35  $\mu$ l. Po nanesení všetkých vzoriek bol nanesený rebríček do štartu č.1 o objeme 3  $\mu$ l a do štartu č.10 o objeme 0,5  $\mu$ l.

#### **3.5.3.3 Elektroforéza SDS-PAGE**

Elektroforetická aparatura bola zapojená do zdroja a napätie bolo nastavené na 50 V. Po 15 minútach bolo napätie zvýšené na 100 V a po uplynutí ďalších 15 minút bolo nastavené napätie na 150 V, na ktorom elektroforéza prebiehala 1 hodinu. Po ukončení programu boli vzorky rozdelené na géloch podrobené western blotu (WB).

### **3.5.4 Imunodetekcia proteínu p53 Westernovým prenosom**

Pre imunodetekciu proteínu p53 bol využitý Westernový prenos proteínov z polyakrylamidového gélu na nitrocelulózovú membránu. Westernový prenos je základná biochemická metóda, ktorá sa využíva na detekciu prítomnosti špecifického proteínu vo vzorke pomocou špecifickej protilátky. Zmes proteínov sa najprv rozdelí na základe veľkosti a / alebo náboja pomocou gélovej elektroforézy. Takto rozdelené proteíny sa následne prenesú z gélu na membránu a na membráne sa špecifický proteín zviditeľní reakciou s protilátkou.

#### **3.5.4.1 Prenos proteínov z gélu na nitrocelulóзовú membránu pomocou WB**

Po skončení SDS-PAGE bol gél s proteínmi ponorený do sklenenej vane zaliatej 1x blotovacím pufrom. Nasledovalo umiestnenie komponentov do špeciálnej aparatury pre Westernový prenos, tzv. "sendviču". Komponenty boli do aparatury ukladané v 1x blotovacím pufri a v zadanom poradí zospodu nahor. Najskôr bola na spodnú časť umiestnená molitanová podložka, ďalej dva kusy filtračného papiera a gél. Na gél bola položená navlhčená membrána, 2 filtračné papiere a opäť molitanová podložka. Z celého systému boli odstránené vzduchové bubliny a aparatura bola spoločne s chladiacim článkom umiestnená do elektroforetickej blotovacej vane, ktorá bola zaliata 1x blotovacím pufrom. Aparatura bola do vane uložená tak, aby gél sa záporne nabitými proteínmi (obalenými SDS) smeroval k anóde. Westernový prenos prebiehal pri 150 mA po dobu 90 minút.

#### **3.5.4.2 Blokovanie membrány a aplikácia protilátok**

Po skončení prenosu bola membrána vybratá z aparatury a bola premiestnená do sklenenej vane s blokovacím roztokom. Membrány boli nechané na trepačke 30 minút pri 160 rpm. Ako primárna protilátka bola použitá monoklonálna protilátka „DO-1“, protilátka rozpoznávajúca proteín p53 na aminokyselinách 21-25, v 5% sušenom mlieku v pomere 1:1 000. Po aplikácii bola membrána ponechaná cez noc pri 4 °C a 160 rpm. Nasledujúci deň bol roztok s obsahom protiláty odstránený a membrána bola premytá celkom päťkrát v 1x PBS, vždy 5 minút pri 160 rpm. Po premytí bola vaňa zaliata 10 ml blokovacieho roztoku obsahujúceho polyklonálnu sekundárnu protilátku Anti-mouse IgG s peroxidázou ako reportérovým enzýmom, riedenie v blokovacím roztoku bolo 1:10 000. Vaňa bola nechaná 1 hodinu pri 160 rpm.

#### **3.5.4.3 Analýza membrány**

Po odstránení roztoku so sekundárnou protilátkou a opätovnom päťnásobnom premytí 1x PBS bola membrána prevrstvená pripravenou zmesou roztoku A (West Pico Stable Peroxid Solution) a roztoku B (West Pico Luminol Enhancer solution) v pomere 1:1 z detekčného kitu „supersignal West Pico“. Chemiluminiscencia bola okamžite snímaná na prístroji Amersham Imager 680.

### **3.6 Príprava plazmidovej DNA**

#### **3.6.1 Príprava kompetentných buniek**

Pre prípravu kompetentných buniek boli použité komerčné bunky *Escherichia Coli* STBL3. Do 50 ml centrifugačných skúmaviek bolo pripravených 10 ml LB média, ktoré boli zaočkované bunkami STBL3. Kultúry boli inkubované cez noc pri 37 °C a 300 rpm.

Do vopred pripravených 500 ml sterilných Erlenmeyerových baniek s 50 ml LB médiom zahriateho na 37 °C bol pridaný 1 ml bakteriálnej kultúry inkubovanej cez noc a kultúra bola ďalej inkubovaná pri 37 °C a 300 rpm do doby, kým optická hustota nedosiahla hodnôt v rozmedzí 0,5-0,7. Po dosiahnutí žiadanej optickej hustoty boli kultúry prenesené do vychladených 50 ml centrifugačných skúmaviek. Kultúry boli inkubované 10 minút na ľade a následne boli centrifugované pri 6 000 x g a 4 °C po dobu 10 minút. Supernatant bol odliaty a pelet bol resuspendovaný v 10 ml 0,2 M CaCl<sub>2</sub>. Po 25 minútovej inkubácii boli kultúry opäť centrifugované pri 6 000 x g a 4 °C po dobu 10 minút a následne bol pelet resuspendovaný

v 1 ml 0,2 M CaCl<sub>2</sub> a 0,2 ml 80% glycerolu. Takto pripravené kompetentné bunky boli napipetované po 100 µl do sterilných 1,5 ml skúmaviek, zmrazené v tekutom dusíku a uložené v hlboko mraziacom boxe pri -80 °C.

### 3.6.2 Transformácia plazmidovej DNA do *Escherichia coli*

K 50 µl pripravených kompetentných buniek *Escherichia Coli* STBL3 bolo pridaných 80 µg plazmidovej DNA a zmes bola inkubovaná 30 minút na lade. Ako negatívna kontrola bola použitá jedná skúmavka s kompetentnými bunkami bez vlozenej plazmidovej DNA. Po inkubácii boli vzorky podrobené teplotnému šoku pri teplote 42 °C po dobu 45 sekúnd. Po teplotnom šoku boli vzorky znovu inkubované 2 minúty na ľade a k zmesi bolo pridaných 250 µl predhriateho SOC média. Takto pripravené vzorky boli inkubované 1 hodinu pri 37 °C a 250 rpm. Na vopred pripravené LB misky s obsahom 1% ampicilínu bolo rozotrených 100 µl kultúry a misky boli inkubované cez noc pri 37 °C. Nasledujúci deň boli transformanty skontrolované a boli rozotrené pomocou krížového rozteru.

### 3.6.3 Izolácia plazmidovej DNA

Z narastených krížových rozterov bola odobratá jedna kolónia a preočkovaná do 5 ml tekutého LB média s rovnakým obsahom antibiotika. Vzorky boli inkubované po dobu 16-18 hodín pri teplote 37 °C a 140 rpm. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky postupne prenesené do 2 ml skúmaviek a stočené pri 10 000 x g po dobu 1 min. Po odliatí supernatantu bola z bunkových peletov vyizolovaná plazmidová DNA pomocou E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kitu od firmy OMEGA BIO-TEK. K bunkovým peletom bolo pridaných 250 µl roztoku I s pridanou RNázou, zmes bola dôkladne resuspendovaná pomocou vortexu a následne boli roztoky prenesené do nových 1,5 ml skúmaviek. K vzorkám bolo pridaných 250 µl roztoku II a vzorky boli opatrne premiešané pomalým otáčaním skúmaviek 6-8x. Lýza bola ukončená prídavkom 350 µl roztoku III a vzorky boli premiešané jemným pootáčaním skúmaviek až do získania bielej zrazeniny. Lyzát bol následne klarifikovaný 10 minútovou centrifugáciou pri maximálnych otáčkach centrifúgy (14 000 x g). Kolóna Spin Column bola vložená do 2 ml zbernej skúmavky a celý objem supernatantu bol opatrne prenesený na kolónu tak, aby sa pelet neuvolnil. Centrifugáciou po dobu 1 min pri maximálnych otáčkach a laboratórnej teplote bol lyzát prefiltrovaný a plazmidová DNA bola naviazaná na silikagélovú membránu. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty a membrána bola premytá 500 µl HBC pufru s pridaným 100 % izopropanolom. Po opakovanej centrifugácii a zliatí odpadného roztoku bolo pridaných 700 µl DNA Wash Bufferu s pridaným 100 % etanolom a vzorky boli znovu centrifugované pri maximálnych otáčkach po dobu 30 s. Membrána bola vysušená od premývacieho pufru dvojminútovou centrifugáciou pri maximálnych otáčkach pri laboratórnej teplote. Kolóny boli premiestnené do novej skúmavky a na vysušenú membránu bolo pridaných 50 µl elučného pufru. Po 1 minúte bola získaná izolovaná plazmidová DNA centrifugáciou a získané vzorky boli podrobené stanoveniu koncentrácie a čistoty spektrofotometricky na prístroji NanoDrop.

### 3.6.4 Analýza izolovanej DNA pomocou agarovej elektroforézy

Na analýzu izolovanej plazmidovej DNA bola využitá elektroforetická metóda v agarózovom géle. Bolo pripravených 40 ml 1 % roztoku agarózy v 1x TAE pufru a následne bol roztok zahrievaný až do doby, kým nebol získaný úplne číry roztok. Množstvo odparenej vody bolo sledované pomocou merania. Agarózový gél bol schladený pri laboratórnej teplote za

### 3.6.5 Transformácia plazmidovej DNA do kvasinkových expresných systémov

31

### 3.6.6 Luciferázový reportérový test

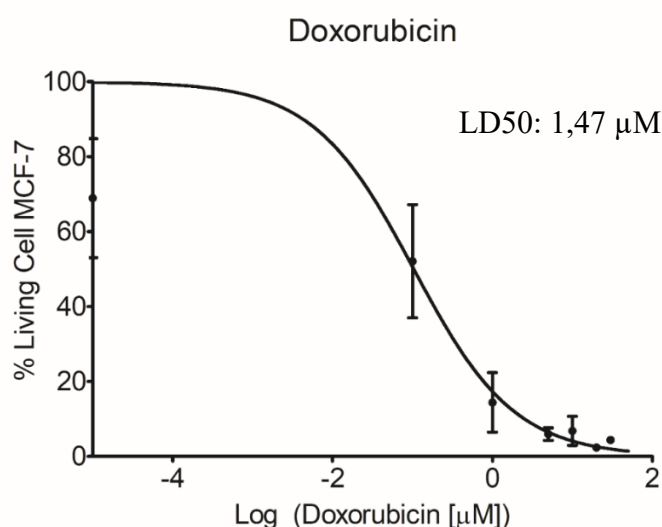
Pre luciferázový reportérový test boli použité kvasinkové kultúry transformované podľa postupu v kapitole 3.3.5.1. Do 96-jamkovej doštičky bolo napipetovaných 120  $\mu$ l SRltA média, ku ktorým bola pridaná a riadne resuspendovaná vždy rovnaká časť rozotreného obdĺžnika v piatich opakovaníach. Do novej 96-jamkovej doštičky bolo prenesených 60  $\mu$ l suspenzie z prvého kroku a do výsledného objemu 120  $\mu$ l bolo pridaných 60  $\mu$ l média s požadovaným prídavkom galaktózy. Všetky takto pripravené doštičky boli obalené parafilmom a inkubované pri 30°C/160 rpm/ 6-24 hodín. Po uplynutí stanovenej inkubačnej doby bola stanovená optická hustota v jednotlivých bunkách pomocou čítačky pri 600 nm. Následne bolo 20  $\mu$ l homogénnej kultúry prenesených multikanálovou pipetou do 384-jamkovej doštičky. Do každej jamky bolo pridaných 20  $\mu$ l 2x koncentrovaného lyzačného puferu „Passive lysis buffer“. Táto zmes bola inkubovaná na 300 rpm po dobu 15 min pri izbovej teplote. Tesne pred analýzou bolo pridaných 20  $\mu$ l luciferázovej reagentie „Bright Glo Luciferase assay systema“. Bioluminescencia bola následne meraná na prístroji Synergy Hybrid Multi-Mode Microplate Reader.



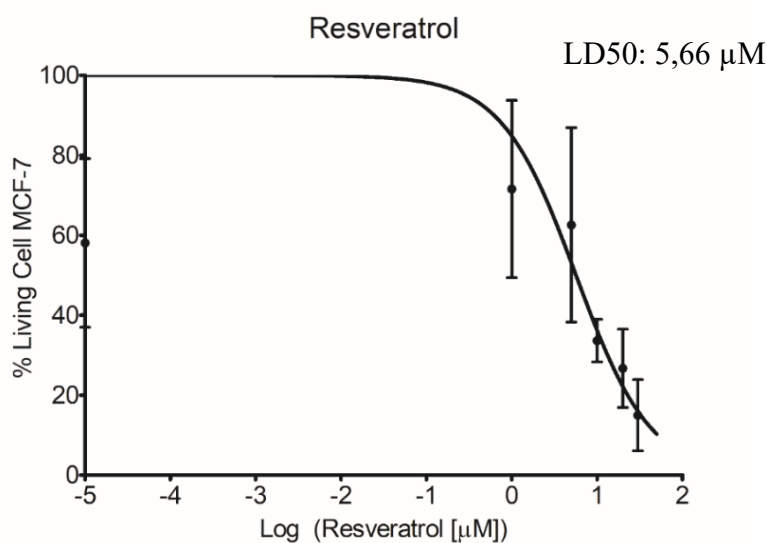
## 4 Výsledky a diskusia

### 4.1 Testy viability na bunekovej línii MCF-7

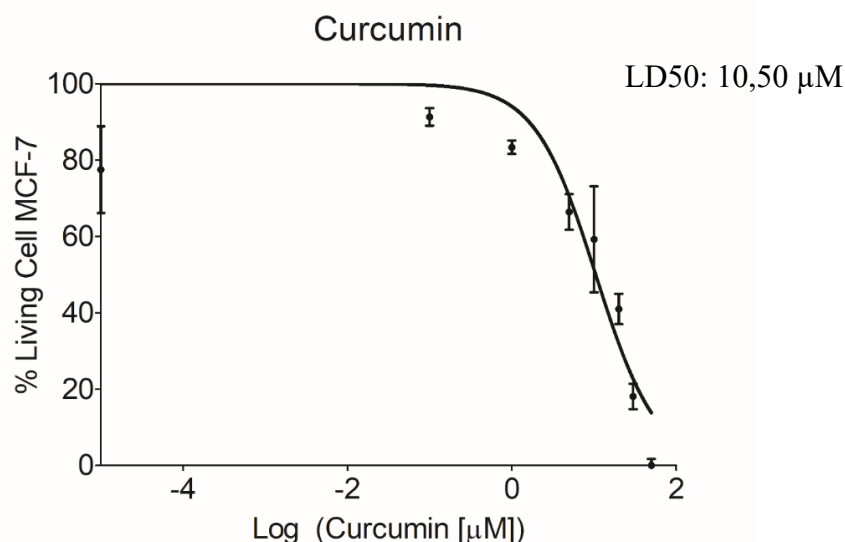
Primárnym krokom pri testovaní viability buniek MCF-7 a vplyvu cytostatík, toxínov a polyfenolických látok bolo zistiť letálnu dávku jednotlivých zlúčenín pre 50 % buniek – tzv. LD50. Využili sme spektrofotometrický test viability pomocou zlúčeniny MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Živé bunky sú schopné toto farbivo premeniť na modro-fialový kryštalický formazán, ktorého absorbanciu je možné detekovať pri 595 nm [70]. Pre zistenie toxicity doxorubicínu, resveratolu a kurkumínu boli použité koncentrácie od 0 po 50  $\mu\text{M}$  zlúčeniny. Na základe nameraných dát boli vypracované grafy (Graf 1, Graf 2 a Graf 3) so závislosťou živých buniek v percentách na logaritme koncentrácií sledovanej látky po 12 hod ošetrov.



Graf 1: Závislosť počtu živých buniek v percentách na dekadickom logaritme koncentrácie doxorubicínu po 12 hod ošetrov. LD50 doxorubicínu bola určená na 1,47  $\mu\text{M}$ .



Graf 2: Závislosť počtu živých buniek v percentách na dekadickom logaritme koncentrácie resveratrolu po 12 hod ošetrov. LD50 resveratrolu bola určená na 5,66  $\mu\text{M}$ .



Graf 3: Závislosť počtu živých buniek v percentách na dekadickom logaritme koncentrácie kurkumínu po 12 hod ošetrení, LD50 bola určená na 10,50  $\mu\text{M}$ .

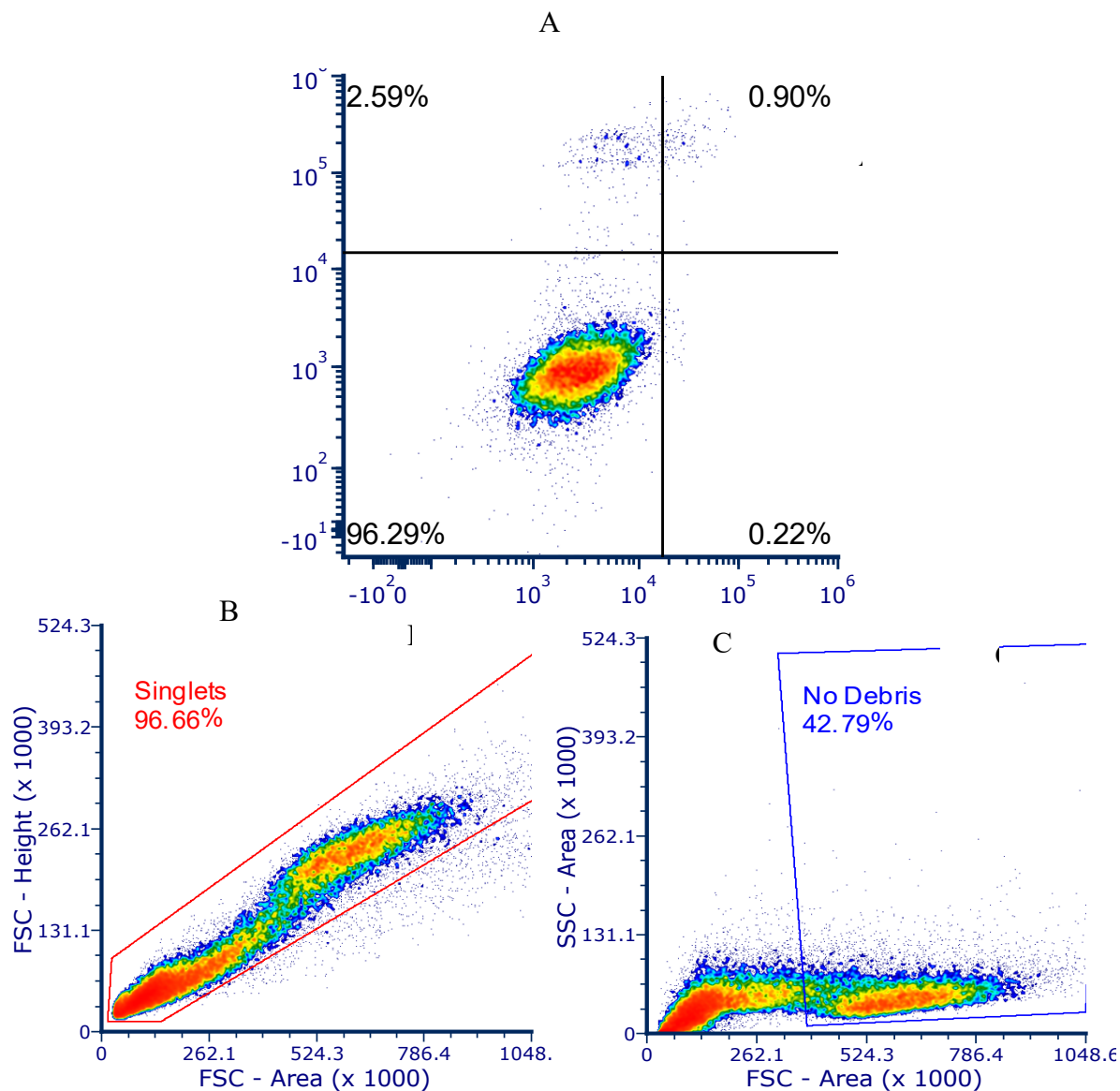
Z týchto grafov a pomocou programu Prisma sme následne zistili letálnu dávku pre 10 % buniek - LD10, 50 % buniek - LD50 a 90 % buniek - LD90. Zistené hodnoty pre jednotlivé zlúčeniny sú uvedené v Tabuľka 2. Z výsledkov je jednoznačné, že cytostatikum doxorubicín ma najvyšší vplyv na viabilitu buniek. Oproti tomu prírodné polyfenolické látky vykazujú asi 5 až 10-krát nižšiu toxicitu. Tiež bolo zistené, že resveratrol má silnejšie toxické účinky na bunky MCF-7 ako kurkumín. Pomocou MTT testu však nebolo možné určiť stav buniek. Tieto látky vykazujú vysoké apoptotické vlastnosti a preto bola následne využitá metóda prietokovej cytometrie.

Tabuľka 2: Získané koncentrácie LD10, LD50 a LD90 pomocou programu Prisma

	Doxorubicín [ $\mu\text{M}$ ]	Resveratrol [ $\mu\text{M}$ ]	Kurkumín [ $\mu\text{M}$ ]
LD10	0,12	0,62	1,62
LD50	1,47	5,66	10,50
LD90	13,24	51,62	68,21

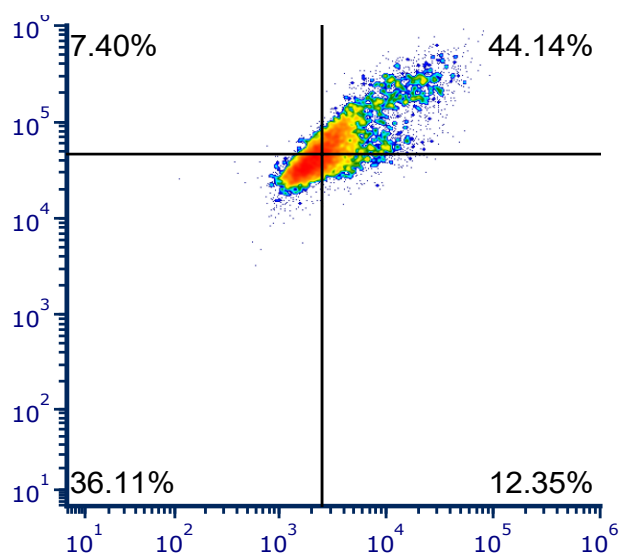
Pomocou prietokovej cytometrie bolo možné sledovať stav jednotlivých buniek po 12 hodinovom ošetrení buniek so zlúčeninami v koncentráciách uvedených v Tabuľka 2. Je známe, že nekrotické bunky prepúšťajú propídium jodid (PI) [83] a pri analýze sa nachádzajú v ľavom hornom kvadrante grafov. Zvyšky fosfatidylserínu prítomné pri apoptóze sú detekované anexínom V [83] a nachádzajú sa v pravom dolnom kvadrante. Bunky, ktoré vykazujú sekundárnu nekrózu, sú pozitívne na anexín V aj na propídium jodid a nachádzajú sa v pravom hornom kvadrante. Živé bunky sú negatívne na oba fluorochromy a sú detekovateľné v ľavom dolnom kvadrante [75].

Primárnym krokom analýzy bolo zistiť stav buniek kultivovaných v čistom médiu, vďaka čomu bolo možné nastaviť základné parametre merania. Toto meranie tiež slúžilo ako negatívna kontrola pre porovnanie so stavom buniek, u ktorých bolo použité ošetrenie vybranými látkami. V Graf 4 sú zaznamenané dáta pre bunky kultivované v čistom médiu. Z celkového počtu bolo zistených 96,29 % živých buniek. Bolo možné eliminovať 3,34 % bunkových zhlukov a vyše 57 % pozostatkov buniek a bunkového odpadu.



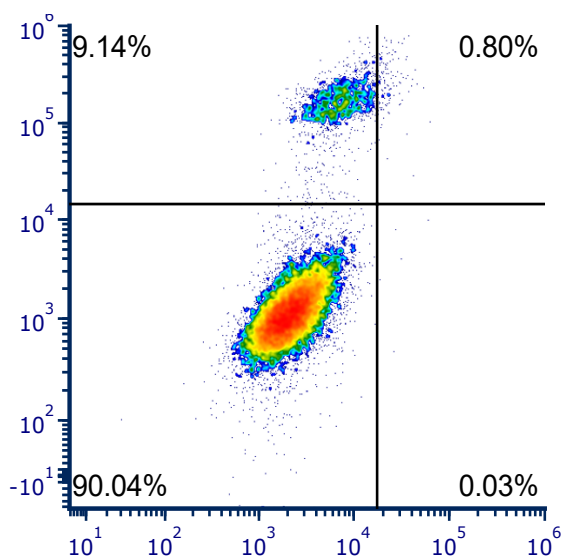
Graf 4: Negatívna kontrola prietokovej cytometrie – bunky MCF kultivované v čistom médiu. Nastavenie osí v grafu (A), eliminácia bunkových zhlukov (B) a rozpadnutých buniek (C).

Prietoková cytometrická analýza s anexín V / PI farbením ukázala, že po 12 hodinovom vystavení buniek MCF-7 doxorubicínom s koncentráciou LD50, podiel nekrotických buniek výrazne stúpol oproti kontrole. Podiel nekrotických buniek sa zvýšil na 51,54 %. Počet apoptotických buniek stúpol na hodnotu 12,35 %. Získané dáta približne odpovedajú hodnote LD50 získanej pri MTT analýze, čo znamená letálny vplyv pre 50% buniek.

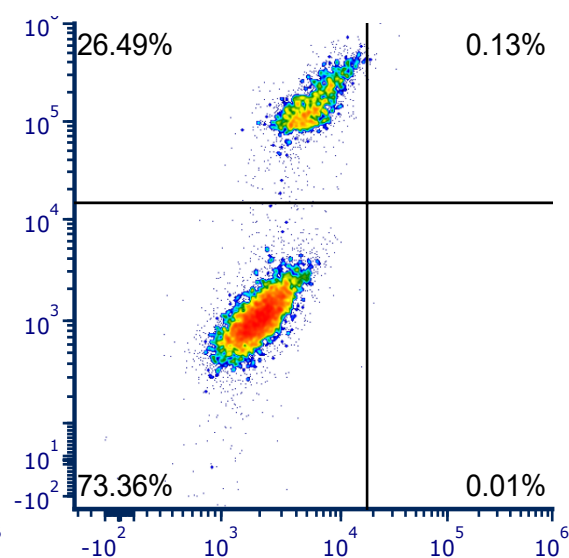


Graf 5: Bunky MCF-7 po pôsobení LD50 doxorubicínu.

Okrem doxorubicínu bol použitý, ako pozitívna kontrola, aj peroxid vodíku, ktorý spôsobuje oxidatívny stres buniek a pri vyšších koncentráciách spôsobuje bunkovú smrť [84]. Bunky MCF-7 boli kultivované 12 hodín v médiu s prídavkom 100  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$  peroxidu vodíku. Výsledky analýzy sú znázornené v grafoch Graf 6 a Graf 7. Vplyv peroxidu vodíka na smrť buniek bol jednoznačne preukázaný, pri koncentrácii 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  podiel nekrotických buniek stúpol z kontrolných 2,59 % na 9,94% pri koncentrácii 250  $\mu\text{M}$  stúpol až na 26,62 %.



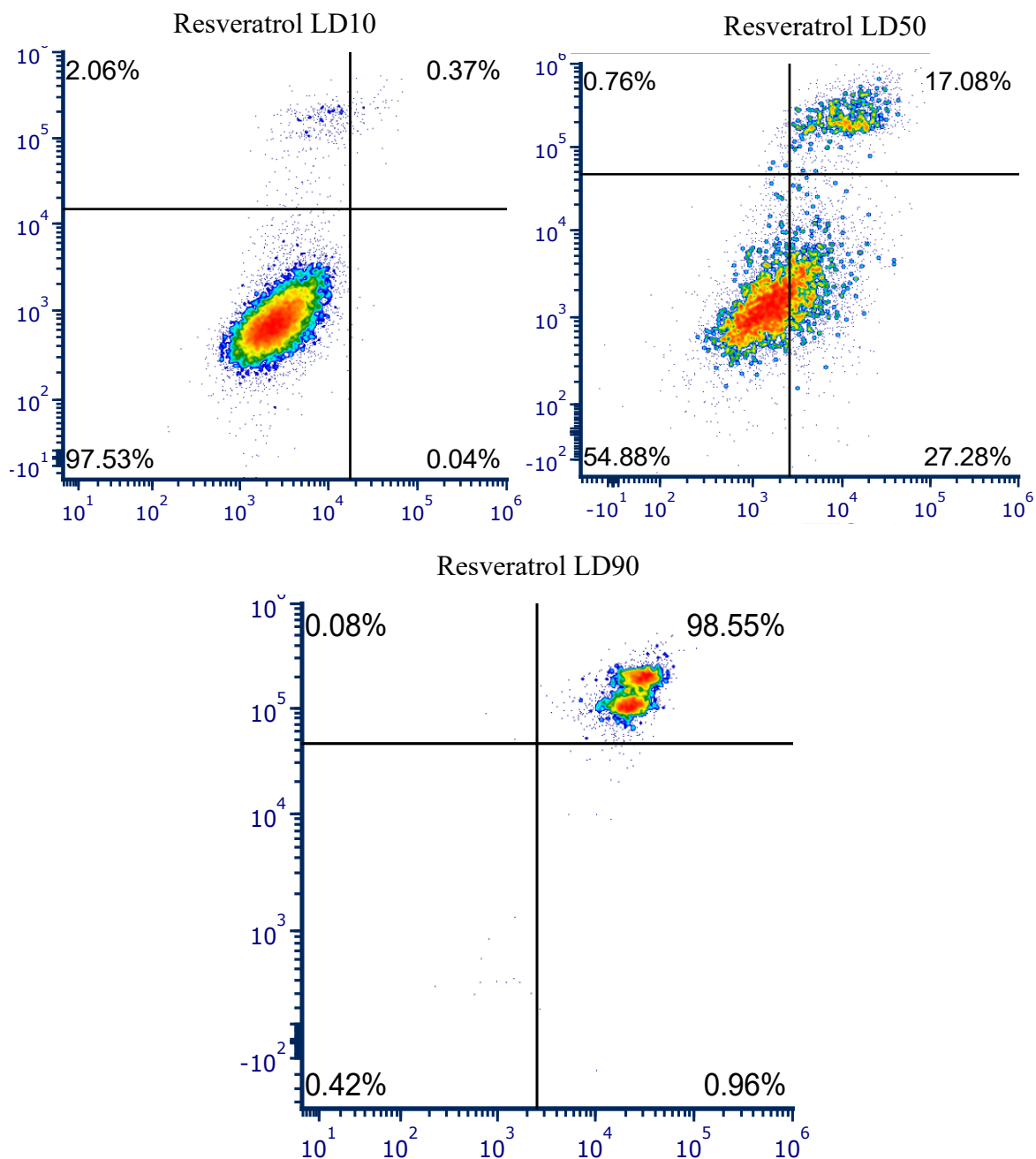
Graf 6: Bunky MCF-7 po pôsobení 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Graf 7: Bunky MCF-7 po pôsobení 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

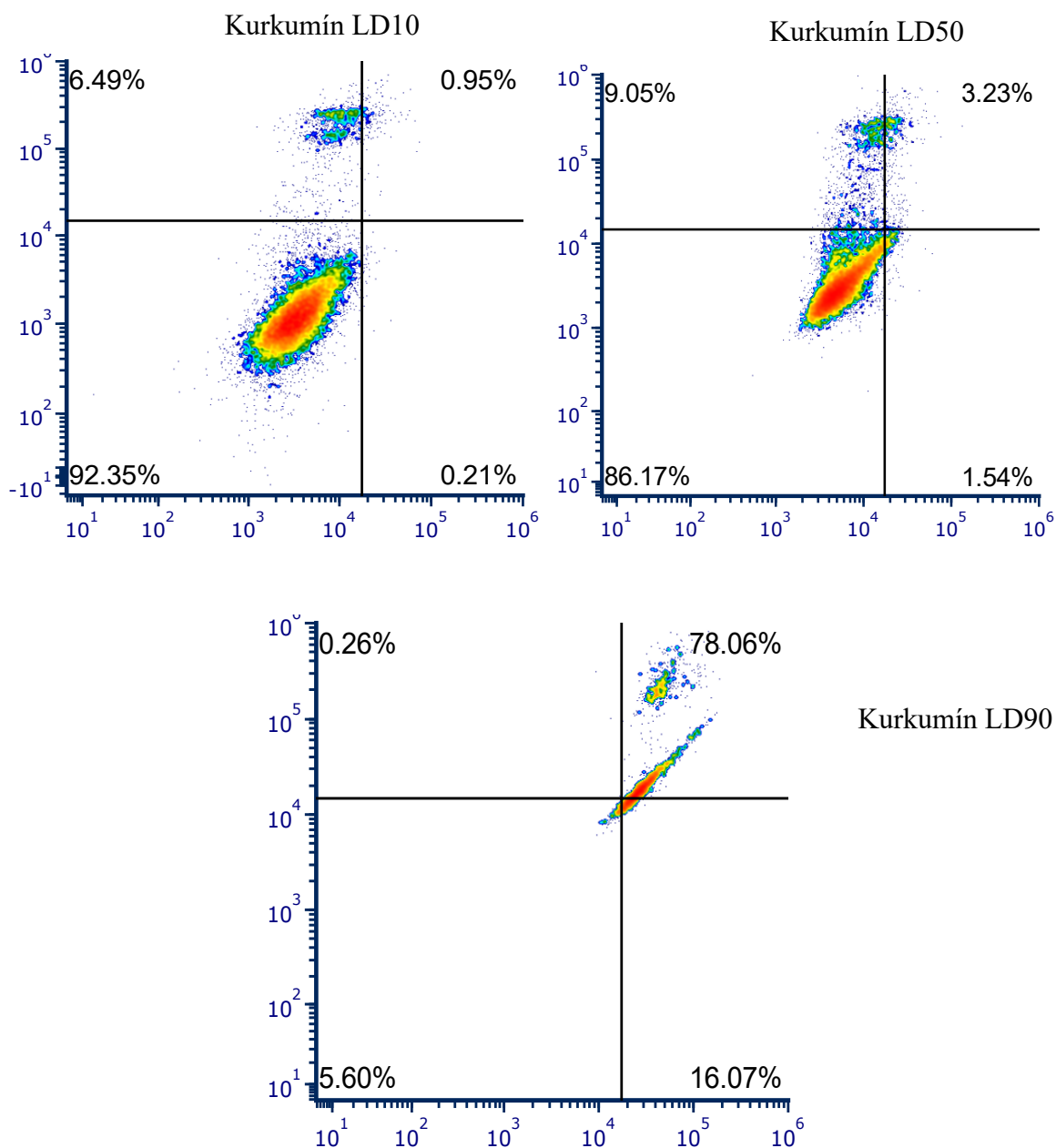
Následne boli analyzované vzorky buniek kultivovaných v médiu s kurkumínom a resveratrolom s koncentráciou LD10, LD50 a LD90. Výsledky pôsobenia resveratrolom sú uvedené v Graf 8. Prítomnosť resveratrolu v médiu s koncentráciou LD10 nemal významný negatívny vplyv na viabilitu buniek. Pri malých koncentráciách sa resveratrol používa práve ako potravinový doplnok, kvôli svojim pozitívnym účinkom na spomalenie starnutia [56]. So zvyšujúcou sa koncentráciou však dochádza k premene pozitívnych účinkov na miernu toxicitu. Po 12 hodinovom ošetrení resveratrolom s použitím koncentrácie LD50 sa podiel živých buniek

znižil z kontrolných 96,29 % na 54,88 % a pri LD90 na 0,42 %. Pri použitej koncentrácii LD50 je možné sledovať okrem primárnej nekrózy aj apoptózu pri 27,28% buniek a po pôsobení resveratrolu s LD90 po 12 hodinách vykazovala väčšina buniek sekundárnu nekrózu. Tieto výsledky naznačujú nesporne vyvolanú apoptózu resveratrolom.



Graf 8: Bunky MCF-7 po 12 hodinovom pôsobení LD10, LD50 a LD90 resveratrolu.

Výsledky analýzy vzoriek ošetrovaných s kurkumínom sú znázornené v Graf 9. Pri použitej koncentrácii LD10 došlo k 4 % nárastu nekrotických buniek oproti kontrolnému meraniu, u buniek ošetrovaných s koncentráciou LD50 počet živých buniek klesol o 10,12 % a pri LD90 až o 90,69 %. Tieto hodnoty potvrdzujú správnosť spektrofotometrickej analýzy. Pri analýze stavu jednotlivých buniek ošetrovaných s kurkumínom bolo možné sledovať okrem primárnej nekrózy aj programovanú bunecnú smrť – apoptózu a sekundárnu nekrózu.



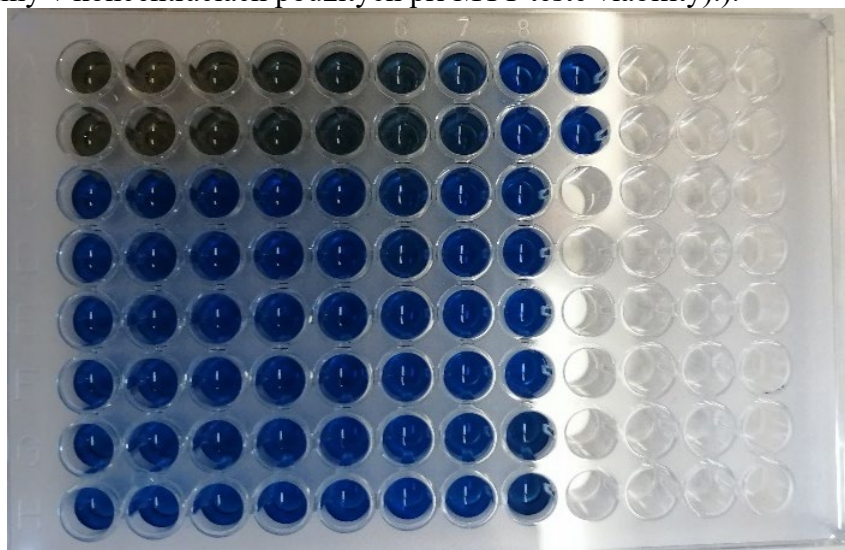
Graf 9: Bunky MCF-7 po pôsobení LD10, LD50 a LD90 kurkumínu.

Na základe výsledkov bolo možné so zvyšujúcou sa koncentráciou pridávaných látok predpokladať prítomnosť apoptotických proteínov. Pozornosť bola zameraná na proteín p53, ktorý je jedným z faktorov navodzujúcich apoptózu pri bunkovom strese [65]. Bunky po použití daných látok boli lyzované a podrobené špecifickej imunochemickej analýze Westernovým prenosom.

## 4.2 Analýza hladiny proteínu p53 v bunkových líniiach MCF-7

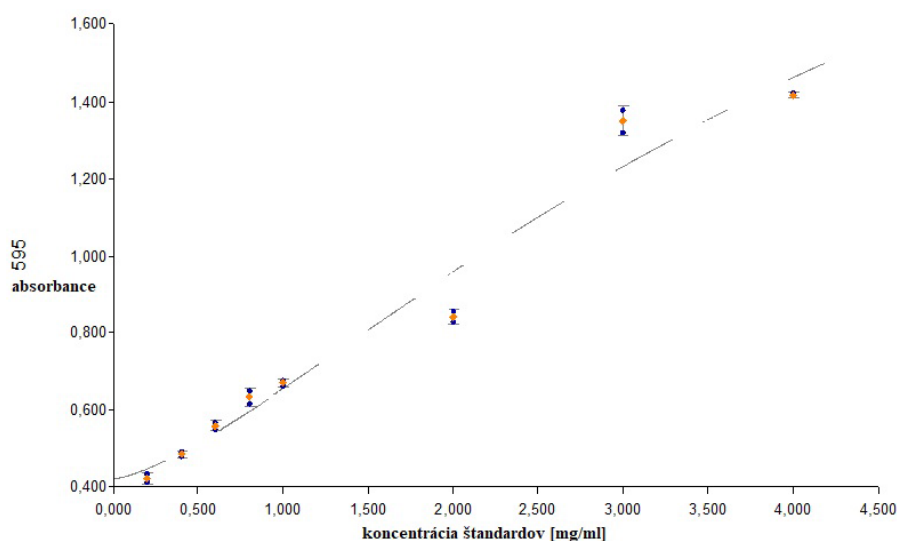
### 4.2.1 Analýza celkovej koncentrácie proteínov po ošetroaní

Po 12 hodinovej inkubácii buniek s cytostatikami a polyfenolickými látkami boli bunky podrobené lýze a celková koncentrácia proteínov bola stanovená pomocou Bradfordovej metódy (Obrázok 11: Analýza koncentrácie celkových proteínov podľa Bradforda (Riadky AB – kalibračná rada, riadky CD – kurkumín, riadky EF – resveratrol, riadky GH – doxorubicín, všetky zlúčeniny v koncentráciách použitých pri MTT teste viability).).



Obrázok 11: Analýza koncentrácie celkových proteínov podľa Bradforda (Riadky AB – kalibračná rada, riadky CD – kurkumín, riadky EF – resveratrol, riadky GH – doxorubicín, všetky zlúčeniny v koncentráciách použitých pri MTT teste viability).

Tabuľka 3 obsahuje jednotlivé absorbancie a vypočítané koncentrácie proteínov v jednotlivých lyzátach pomocou kalibračnej krivky (Graf 10). Z tabuľky je vidieť, že celková koncentrácia proteínov po lýze ošetrovaných buniek sa signifikantne nezmenila.



Graf 10: Kalibračná krivka pre určenie celkových proteínov podľa Bradforda.



Tabuľka 3 Namerané absorbancie a vypočítané koncentrácie celkových proteínov podľa Bradforda v dvoch opakovaníach.

Koncentrácia cytostatík [ $\mu\text{M}$ ]	0	0,1	1	5	10	20	30	50	
Doxorubicín 1	1,245	1,308	1,39	1,416	1,392	1,096	1,378	1,318	Absorbancia pri 595 nm
	0,813	0,876	0,958	0,985	0,961	0,665	0,947	0,887	Blank 595
	3,052	3,312	3,668	3,79	3,68	2,487	3,616	3,356	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
Doxorubicín 2	1,286	1,283	1,389	1,476	1,433	1,143	1,357	1,316	Absorbancia pri 595 nm
	0,855	0,851	0,957	1,045	1,001	0,711	0,926	0,885	Blank 595
	3,222	3,207	3,663	4,075	3,867	2,657	3,525	3,347	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
Resveratrol 1	1,235	1,23	1,335	1,34	1,383	1,295	1,345	1,327	Absorbancia pri 595 nm
	0,803	0,799	0,904	0,909	0,951	0,863	0,913	0,895	Blank 595
	3,013	2,995	3,427	3,449	3,636	3,256	3,469	3,39	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
Resveratrol 2	1,282	1,281	1,382	1,375	1,38	1,311	1,339	1,327	Absorbancia pri 595 nm
	0,85	0,849	0,951	0,944	0,949	0,88	0,908	0,896	Blank 595
	3,202	3,198	3,635	3,604	3,626	3,326	3,445	3,393	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
Kurkumín 1	1,201	1,321	1,262	1,337	1,365	1,314	1,243	1,058	Absorbancia pri 595 nm
	0,77	0,889	0,831	0,906	0,934	0,883	0,812	0,627	Blank 595
	2,881	3,367	3,123	3,437	3,559	3,337	3,045	2,35	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
Kurkumín 2	1,231	1,301	1,277	1,384	1,368	1,408	1,26	1,038	Absorbancia pri 595 nm
	0,8	0,87	0,845	0,953	0,936	0,977	0,828	0,607	Blank 595
	2,998	3,284	3,183	3,644	3,57	3,753	3,112	2,279	Koncentrácia proteínov [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]

#### 4.2.2 Analýza hladiny proteínu p53

Pre overenie vplyvu cytostatík a fenolických látok na hladinu proteínu p53 boli jednotlivé lyzáty podrobené proteínovej analýze. Najprv boli proteíny separované podľa ich veľkosti pomocou elektroforézy v polyakrylamidovom géle v prítomnosti dodecylsulfátu sodného. Následne bol proteín p53 prenesený na nitrocelulózovú membránu pomocou metódy „western blotting“. Po prenose proteínov z gélu na membránu bol proteín p53 viazaný špecifickou monoklonálnou protilátkou DO1, ktorá sa viaže na centrálnu doménu proteínu p53 [85]. Na túto primárnu protilátku bola následne aplikovaná sekundárna protilátka Anti-mouse IgG s peroxidázovou aktivitou, vďaka ktorej bolo možné sledovať prítomnosť proteínu p53 prostredníctvom chemiluminiscenčného signálu.

Na Obrázok 12 sa nachádza nitrocelulózová membrána s prenesenými proteínmi, ktoré boli získané lýzou buniek MCF-7 po pôsobení doxorubicínu a peroxidu vodíka. V štarte 2 sa nachádzajú proteíny získané z buniek ošetrovaných 100  $\mu\text{M}$  peroxidom vodíku. Pri tejto koncentrácii sme prietokovou cytometriou zistili 0,8 %-ný podiel buniek v štádiu sekundárnej nekrózy. Jedná sa o kombinovaný stav nekrózy a apoptózy, a preto sme mohli predpokladať

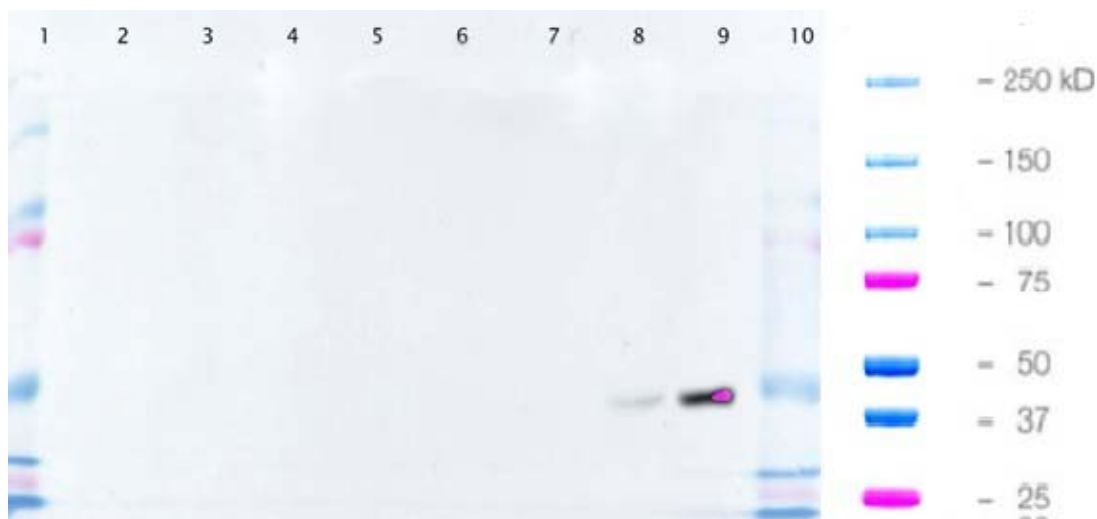


čiastočné zvýšenie hladiny proteínu p53. Táto hypotéza bola potvrdená, nakoľko pri veľkosti 50 kDa sme zaznamenali viditeľný signál po chemiluminescenčnej detekcii. Pri koncentrácii 250  $\mu\text{M}$  peroxidu vodíka bol tento signál o niečo menší, pravdepodobne došlo k usmrteniu vyššieho podielu buniek. V štarte č.4 sa nachádza doxorubicín s koncentráciou 0,1  $\mu\text{M}$ . Pre doxorubicín bola LD10 stanovená na 0,14  $\mu\text{M}$ . Práve pre vzorku s koncentráciou 0,1  $\mu\text{M}$  doxorubicínu sme zaznamenali najsilnejší signál. U doxorubicínu s koncentráciou LD50 (1,4  $\mu\text{M}$ ) sme predpokladali mierne zníženie hladiny p53, vplyvom degradácie proteínu, čo sme aj potvrdili westernovou analýzou – viditeľný signál v štarte 5, kde sa nachádzal lyzát buniek ošetrovaných s 1  $\mu\text{M}$  doxorubicínom. So zvyšovaním koncentrácie doxorubicínu (štart 6, 7, 8, 9) dochádzalo k znižovaniu intenzity signálu. V štarte č.9, s najvyššou koncentráciou doxorubicínu bol prekvapivo viditeľný chemiluminescenčný signál. Záverom je fakt, že doxorubicín má vplyv na hladinu proteínu p53, a so zvyšujúcou sa koncentráciou doxorubicínu dochádza k jeho degradácii (polčas rozpadu len niekoľko hodín [29], prípadne mutáciám, ktoré nie sú detekovateľné použitou protilátkou).



Obrázok 12: Nitrocelulózoová membrána po westernovom prenose a detekcii chemiluminiscencie. Štart č.1 a č.10 rebríček - Bio-Rad Precision plus protein 250 KDa. Štart č.2 – lyzát po ošetrovaní 100  $\mu\text{M}$  peroxidu vodíku; Štart č.3 – lyzát po ošetrovaní 250  $\mu\text{M}$  peroxidu vodíku; Štart č.4 – lyzát po ošetrovaní 0,1  $\mu\text{M}$  doxorubicínu; Štart č.5 – lyzát po ošetrovaní 1  $\mu\text{M}$  doxorubicínu; Štart č.6 – lyzát po ošetrovaní 5  $\mu\text{M}$  doxorubicínu; Štart č.7 – lyzát po ošetrovaní 10  $\mu\text{M}$  doxorubicínu; Štart č.8 – lyzát po ošetrovaní 20  $\mu\text{M}$  doxorubicínu; Štart č.9 – lyzát po ošetrovaní 50  $\mu\text{M}$  doxorubicínu.

Na Obrázok 13 sa nachádza nitrocelulózoová membrána s prenesenými proteínmi získanými lyzátom buniek ošetrovaných zvyšujúcou sa koncentráciou resveratrolu. Po imunochemickej analýze a detekcie proteínu p53 môžeme usúdiť, že proteín p53 v detekovateľnej koncentrácii sa vyskytoval v bunkách MCF-7 ošetrovaných 30  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  resveratrolom. Jedná sa o koncentráciu približnej LD90, pri ktorej sme pomocou prietokovej cytometrie zistili mierny nárast apoptických buniek a značný nárast buniek v štádiu sekundárnej nekrózy. Z tohto vyplýva, že resveratrol pri vyšších koncentráciách vplyva na hladinu proteínu p53 v bunkách, a práve p53 môže byť jedným faktorom vzniku apoptózy a sekundárnej nekrózy.



Obrázok 13: Nitrocelulózová membrána po westernovom prenose a detekcií chemiluminescencie. Štart č.1 a č.10 rebríček -Bio-Rad Precision plus protein 250 KDa. Štart č.2 – negatívna kontrola, lyzát z čistého média, Štart č.3 – lyzát po ošetrení 0,1  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.4 – lyzát po ošetrení 1  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.5 – lyzát po ošetrení 5  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.6 – lyzát po ošetrení 10  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.7 – lyzát po ošetrení 20  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.8 – lyzát po ošetrení 30  $\mu$ M resveratrolu; Štart č.9 – lyzát po ošetrení 50  $\mu$ M resveratrolu.

Z výsledkov prietokovej cytometrie boli zistené najsilnejšie účinky na apoptózy po pôsobení kurkumínu. Kurkumín spôsobuje zvýšenú hladinu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a peroxidáciu lipidov, čo napomáha k navodeniu programovanej bunecnej smrti [53]. Bolo nutné preveriť spojenie s expresiou proteínu p53. Na Obrázok 14 sa nachádza nitrocelulózová membrána s prenesenými proteínmi z buniek ošetrených s rôznou koncentráciou kurkumínu.



Obrázok 14: Nitrocelulózová membrána po westernovom prenose a detekcií chemiluminescencie. Aplikovaná látka – kurkumín. Štart č.1 a č.10 rebríček -Bio-Rad Precision plus protein 250 KDa. Štart č.2 – negatívna kontrola, lyzát z čistého média, Štart č.3 – lyzát po ošetrení 0,1  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.4 – lyzát po ošetrení 1  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.5 – lyzát po ošetrení 5  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.6 – lyzát po ošetrení 10  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.7 – lyzát po ošetrení 20  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.8 – lyzát po ošetrení 30  $\mu$ M kurkumínu; Štart č.9 – lyzát po ošetrení 50  $\mu$ M kurkumínu.

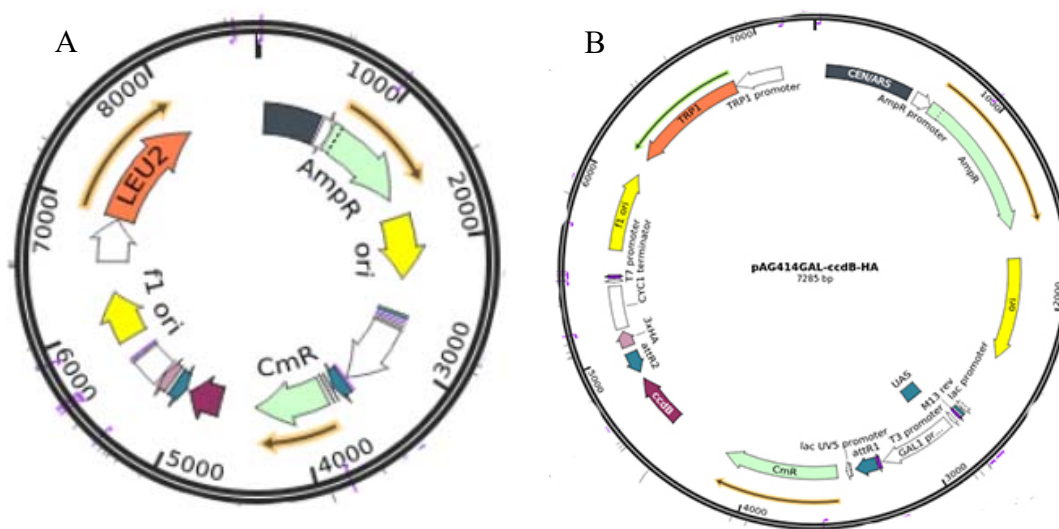
Po detekcii však nebol žiadny luminiscenčný signál zaznamenaný. Experiment bol niekoľkokrát opakovaný s rovnakým výsledkom. Preto je pravdepodobné, že apoptóza spôsobená kurkumínom prebieha iným mechanizmom ako kaskádou spôsobenou proteínom p53 v bunkách alebo je jeho hladina príliš nízka. Tieto výsledky boli overené pomocou experimentov v kvasinkových reportérových systémoch v kapitole 4.4.

### 4.3 Príprava plazmidovej DNA pre transformáciu do kvasinkových systémov

Vplyv skúmaných látok na hladinu proteínu p53 bol preverený tiež v kvasinkových expresných systémoch. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* tento proteín nedokážu exprimovať, preto sú vhodné k cielenej modifikácii. Príprava plazmidovej DNA s cudzorodým génom kódujúcim proteín p53 nebola predmetom tejto práce, avšak popis vložených plazmidov je nevyhnutný pre pochopenie problematiky.

Na Obrázok 15 A sa nachádza prázdny plazmid pAG415GPD-ccdB-HA [86] s dĺžkou 8 717 bp, ktorý bol použitý ako destinačný vektor v druhom kroku GATEWAY klonovania k vloženiu génu *TP53*. GPD promótor zabezpečuje konštitutívnu expresiu žiadaného proteínu. Spomínaný vektor obsahuje rezistenciu proti antibiotikám chloramfenikol a ampicilín, ktoré sa používajú ako selekčné markery pri produkcii v bakteriálnych systémoch. V kvasinkových systémoch sa využíva selekcia pomocou prítomného leucínového promótoru [86].

Na Obrázok 15 B **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** sa nachádza destinačný vektor pAG414GAL-ccdB-HA s veľkosťou 7 285 bp s indukčibilným galaktóзовým promótorom, tiež použitý k cielenej rekombinácii. Tento plazmid obsahuje namiesto leucínového promótoru tryptofánový [87].

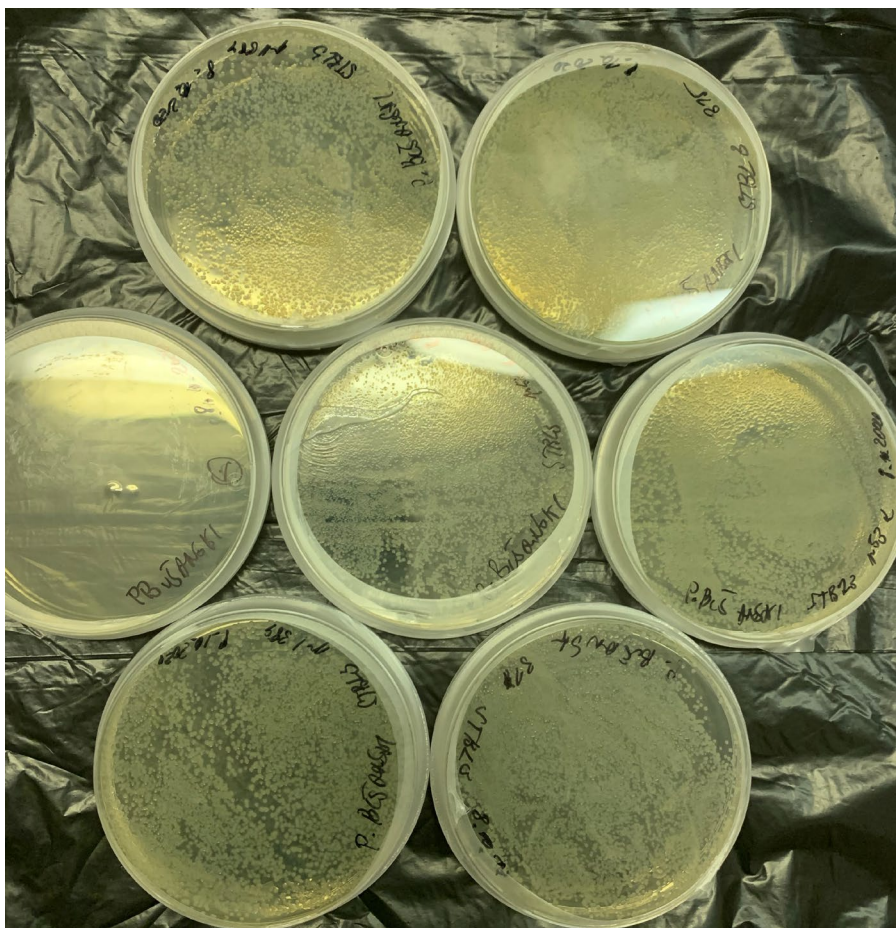


Obrázok 15: Schéma destinačných vektorov: pAG415GPD-ccdB-HA (A) s konštitutívnym promótorom GPD a pAG414GAL-ccdB-HA (B) s indukčibilným galaktóзовým promótorom [86], [87].

Ďalšie 2 plazmidy, ktoré boli potrebné pre umožnenie selekcie úspešných transformantov boli pRS314 a pRS315. Tieto plazmidy sú prázdne vektory a obsahujú promótory pre syntézu tryptofánu (pRS314) a leucínu (pRS315). Opačnou kombináciou týchto plazmidov s plazmidmi pAG414GAL-p53 (+pRS315) a pAG415GPD-p53 (+pRS314) bolo docielené získanie kotransformovaných buniek selektovaných na *ltA* miskách (bez obsahu leucínu a tryptofánu).

Pred samotnou transformáciou týchto plazmidov do kvasinkových expresných systémov bolo potrebné plazmidy namnožiť, pre ktoré bol použitý komerčný bakteriálny kmeň *E.coli*. Po príprave kompetentných baktérií bola prevedená transformácia pomocou teplotného šoku. Transformované plazmidy obsahovali spomínané rezistenčné miesto pre antibiotikum ampicilín, pomocou ktorého bolo možné selektovať úspešne transformované kolónie. Ukážka sa nachádza na Obrázok 16.

Po úspešnej transformácii bola plazmidová DNA izolovaná pomocou komerčného kitu. Koncentrácie jednotlivých plazmidových DNA a ich čistoty sú uvedené v Tabuľke č.4. Čistá DNA má absorpčné maximum pri 260 nm, oproti tomu absorpčné maximum bielkovín je pri 280 nm. Pomer absorbancií 260/280 nm ukazuje čistotu izolovanej DNA. Pre čistú DNA sa pomer absorbancií 260/A280 pohybuje v rozmedzí 1,8 až 2,0. V prípade ak je tento pomer nižší ako 1,8, vzorka je považovaná za kontaminovanú bielkovinami, v prípade ak je vyšší ako 2,0 DNA, vzorka je kontaminovaná RNA [88]. Z tabuľky je zrejmé, že plazmidy mali dostatočnú čistotu a boli vhodné na ďalšiu transformáciu do kvasinkových expresných systémov.



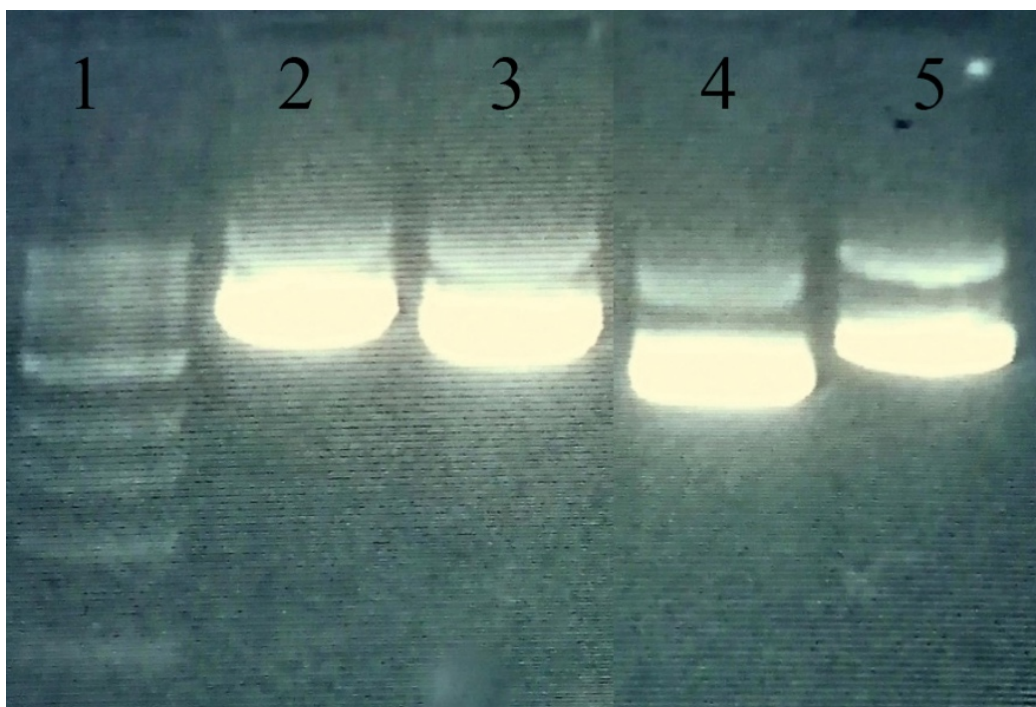
Obrázok 16: Výsledok úspešnej transformácie buniek *E.coli* použitými plazmidovými DNA.

Tabuľka 4. Namerané koncentrácie a čistoty plazmidovej DNA pomocou prístroja NanoDrop.

Plazmid	Koncentrácia [ng/μl]	Čistota 260/280
pAG415GPD-p53	124,805	1,870
pAG414GAL-p53	48,646	1,805
pRS314	59,982	1,845
pRS315	113,463	1,809



Pre overenie správnosti izolovaných plazmidov bola prevedená agarózová elektroforéza. Plazmid pAG415GPD-p53 v štarte 2 má 8 620 párov báz, oproti tomu pAG414GAL-p53 v štarte 3 je o niečo menší (7 285 bp). Veľkosť plazmidov bola potvrdená, nakoľko v signál v štarte 2 je o niečo vyššie ako signál v štarte 3. Plazmidy v štarte 4 a 5 sú prázdne plazmidy bez inzertu, teda i ich veľkosť je menšia v porovnaní s ostatnými plazmidmi.



Obrázok 17. Analýza plazmidových DNA pomocou agarovej elektroforézy. Štart 1 – rebríček (1 kb); 2 – p53 v pAG415GPD; 3 – p53 v pAG414GAL; 4 – pRS314; 5 – pRS315.

#### 4.4 Analýza transaktivačného potenciálu proteínu p53

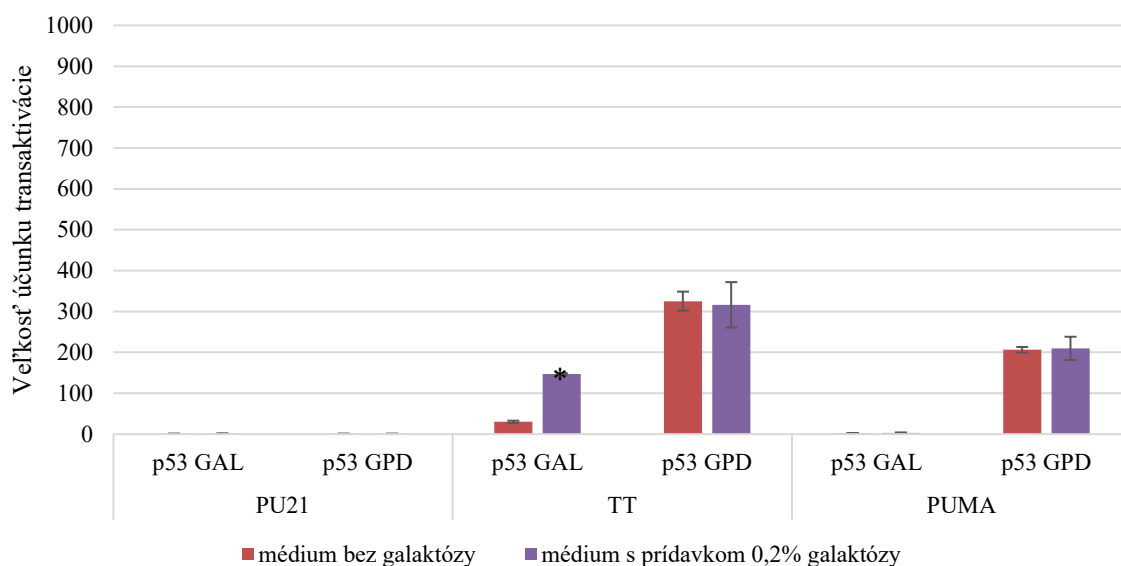
Pomocou luciferázového testu bola preskúmaná transaktivačná aktivita proteínu p53 pri rôznych podmienkach. Princípom tohto testu je schopnosť luciferínu emitovať svetlo pri jeho premene na oxyluciferín. Pre túto konverziu je nevyhnutný enzým luciferáza, ktorá sa produkuje v tomto systéme len v prípade, ak sa proteín p53 naviaže na DNA a umožní tak biosyntézu tohto enzýmu. Množstvo emitovaného svetla je indikátorom transaktivačnej aktivity a hladiny proteínu p53 [27].

Prvým krokom analýzy bol výber vhodného kmeňa *Saccharomyces cerevisiae* s najlepšimi väzbovými vlastnosťami pre proteín p53. Transformované boli tri kmene s obsahom rôznych sekvencií (Tabuľka 5) a bola testovaná transaktivačná odpoveď proteínu p53. Transformované boli plazmidy s inzertom p53 pod inducibilným galaktózovým promótorom a pod konštitutívnym GPD promótorom.

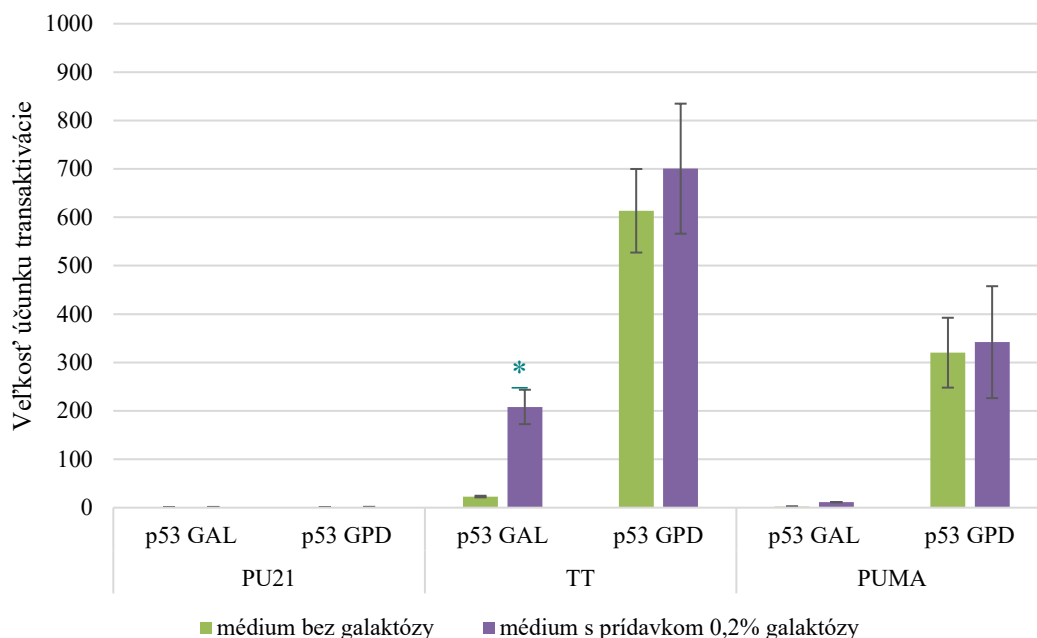
Tabuľka 5: Kmeňe *Saccharomyces cerevisiae* s rôznymi vloženými sekvenciami.

Kmeň	Sekvencia 5' - 3'
p21	GAACATGTCCCAACATGTTG
PUMA	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC
TT	GGGCATGTCTGGGCATGCCC

Pre porovnanie transaktivačného potenciálu p53 v jednotlivých kmeňoch boli dané kmeňe kultivované v SRItA médiu a v SRItA médiu s prídavkom 0,2 % galaktózy pre indukciu expresie proteínov pri použití vektorov s galaktózovým promótorom. Získané výsledky po 6 hodinovej indukcii sú uvedené v Graf 11 a po 24 hodinovej indukcii v Graf 12.



Graf 11: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 po 6 hodinách inkubácie v rôznych kmeňoch *S. cerevisiae*. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdičkou ( $p$  hodnota < 0,05).

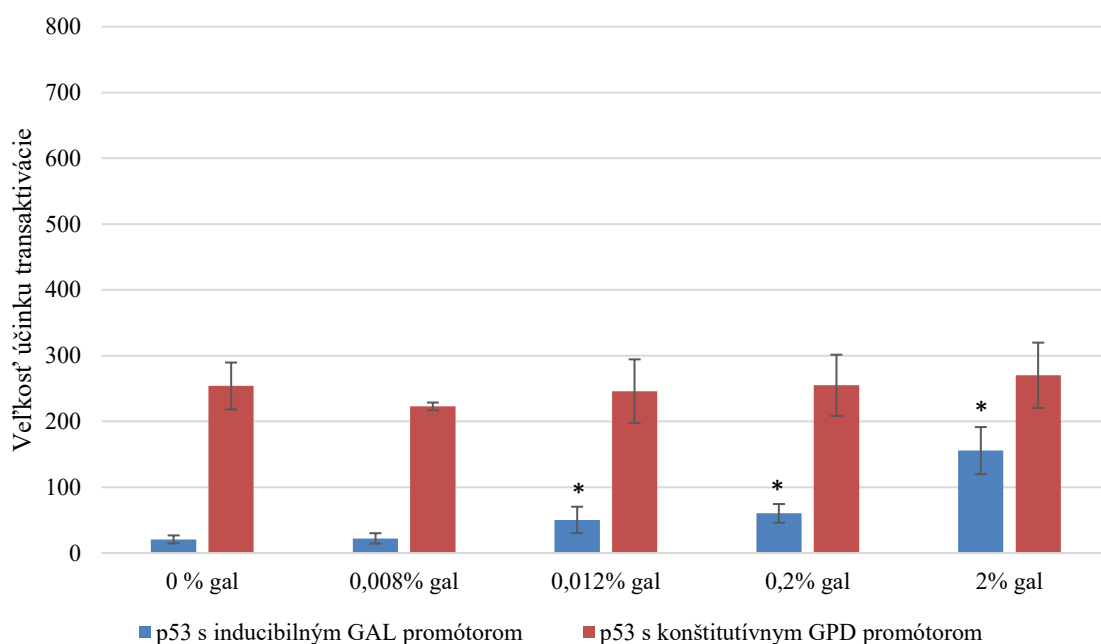


Graf 12: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 po 24 hodinách inkubácie v rôznych kmeňoch *S. cerevisiae*. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdičkou ( $p$  hodnota < 0,05).

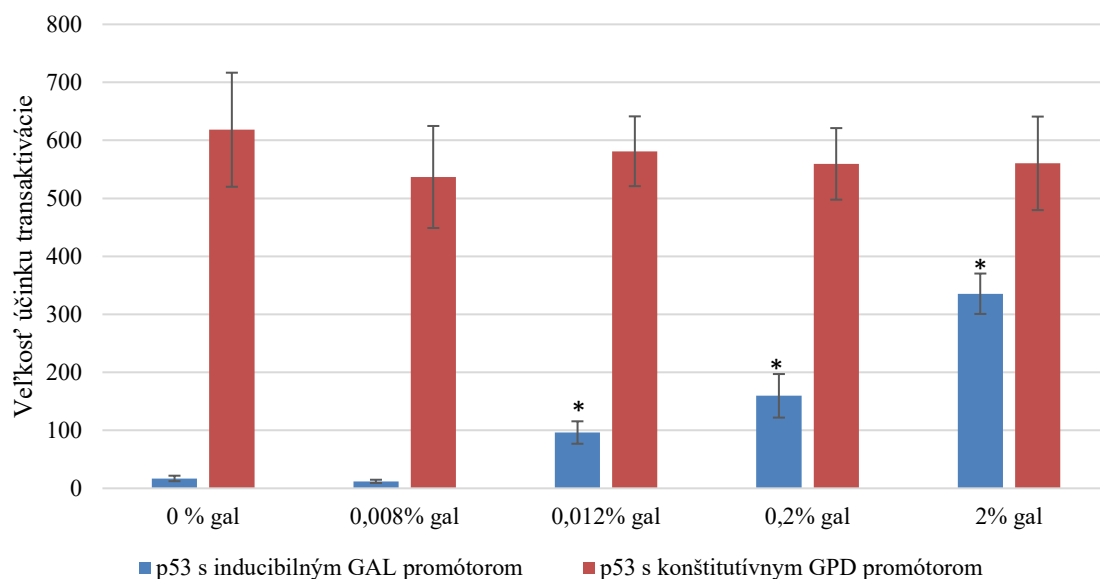
Z výsledkov môžeme usúdiť, že kmeň PU21 nie je vhodným kmeňom pre ďalšiu analýzu, nakoľko u neho nebol zaznamenaný žiadny významný chemiluminescenčný signál. Kmeň PUMA s responzívnou sekvenciou na ktorú sa viaže proteín p53, vykazoval lepšie výsledky. V bunkách transformovaných plazmidom pAG415GPD (konštitutívny promótor) bol transaktivačný potenciál v porovnaní s prázdny plazmidom po 6 hodinách 200x a po 24 hodinách 300x vyšší. V médiu s prídavkom 0,2% galaktózy bol síce pozorovali mierny nárast transaktivačného potenciálu oproti potenciálu v SRltA médiu, avšak tento nárast nebol dostatočne významný, a preto tento kmeň bol taktiež považovaný za nevhodný pre ďalšiu analýzu.

Najlepšie väzbové vlastnosti vykazoval kmeň TT, u ktorého bol nameraný najvyšší transaktivačný signál. V porovnaní s prázdny vektorom bol transaktivačný potenciál pre pAG415GPD po 6 hodinách 300x a po 24 hodinách až 600x vyšší. Okrem toho bol pri TT kmeni zaznamenaný štatisticky významný nárast transaktivačného signálu pri použití galaktózy v systéme s obsahom galaktózového promótoru. V tomto prípade dochádzalo k nárastu transaktivačnej aktivity až 200 krát v porovnaní s prázdny vektorom. Záverom tejto analýzy je, že pre ďalšiu analýzu je najvhodnejším kmeňom *Saccharomyces cerevisiae* s TT inzertom.

Po výbere vhodného kmeňa bol skúmaný vplyv galaktózy na transaktivačný potenciál proteínu p53. Aby bolo možné určiť najvhodnejšiu koncentráciu galaktózy v médiu bolo pripravených 5 médií s rôznou koncentráciou galaktózy. Výsledky sú znázornené v Graf 13 (po 6 hodinovej indukcií) a Graf 14 (po 24 hodinovej indukcií).



Graf 13: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 po 6 hodinách inkubácie v médiách s rôznou koncentráciou galaktózy. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdičkou ( $p$  hodnota < 0,05).



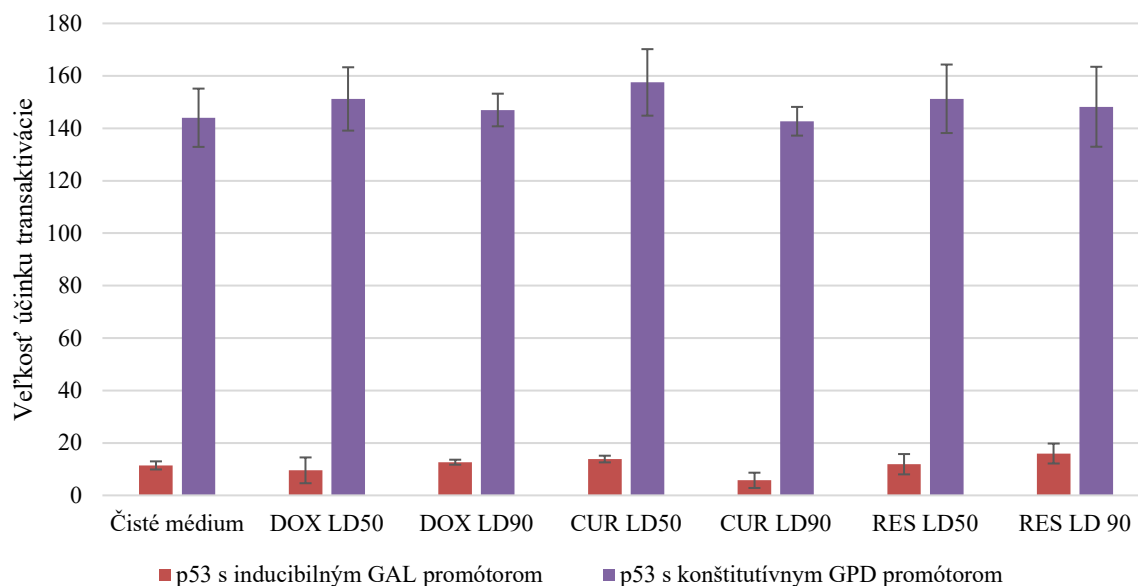
Graf 14: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 po 24 hodinách inkubácie v médiách s rôznou koncentráciou galaktózy. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdíčkou ( $p$  hodnota  $< 0,05$ ).

Porovnaním transaktivačného potenciálu u buniek kultivovaných v SRItA médiu s rôznou koncentráciou galaktózy sme potvrdili, že galaktóza nemá vplyv na transaktivačný potenciál u buniek, ktoré exprimujú proteín pod GPD konštitutívnym plazmidom. Na druhej strane galaktózový promótor je indukčibilný galaktózou, tzn. že prítomnosť galaktózy v médiu je podmienkou pre transkripciu *TP53* a následnú biosyntézu proteínu p53. Pri koncentrácii galaktózy 0,008 % sme zistili štatisticky nevýznamný nárast, tj.  $p$  hodnota u T-testu mala hodnotu 0,77. Najnižšia koncentrácia u ktorej bolo možné sledovať štatisticky významný nárast bola 0,012 % galaktózy v médiu, kde  $p$ -hodnota činila 0,01. So zvyšujúcou sa koncentráciou galaktózy v médiu dochádzalo k nárastu transaktivačného potenciálu. Pre následnú analýzu bola zvolená ako najvhodnejšia koncentrácia 0,012% galaktózy v médiu, a to kvôli strednej a štatisticky významnej transaktivačnej aktivite.

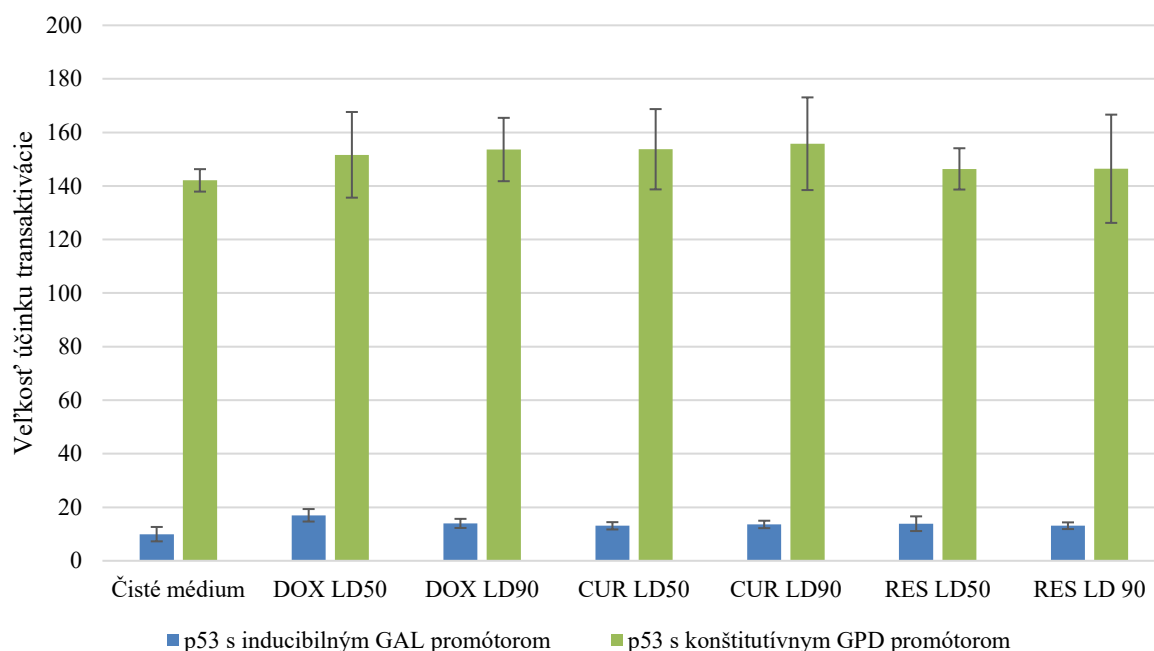
Hlavnou úlohou tejto časti práce bolo zistiť vplyv jednotlivých fenolických látok na transaktivačný potenciál proteínu p53 pomocou kvasinkového reportérového systému. Na základe predchádzajúcich experimentov bol pre následnú analýzu použitý kmeň *Saccharomyces cerevisiae* – TT a pre indukciu indukčibilného galaktózového promótoru 0,012 % galaktóza v médiu. Bol porovnaný vplyv doxorubicínu ako pozitívnej kontroly, ktorý je silným cytostatikom často využívaným pri protinádorových liečbach. Doxorubicín sa viaže na DNA a tým znemožňuje jej replikáciu pri množení buniek [6]. Na transaktivačný potenciál p53 môže mať doxorubicín rôzny vplyv. Jednak na neho môže bunka reagovať zvýšením hladiny p53 pre indukciu apoptózy a tým spôsobiť nárast transaktivačného potenciálu. Na druhej strane môže mať aj negatívny vplyv a to pri expozícii vysokej koncentrácií po dlhšiu dobu, kedy môže dochádzať k usmrteniu väčšiny buniek, a tým k zníženiu transaktivačného signálu. Ďalšími skúmanými látkami sú polyfenolické látky vyskytujúce sa v potravinách, resveratrol a kurkumín. Pre podrobnejšiu analýzu vplyvu týchto látok boli použité dve rôzne koncentrácie daných látok, a to hodnoty LD50 a LD90 získaných z testov viabilít v kapitole 4.1.



Pre kontrolu bol meraný transaktivačný potenciál v na začiatku indukcie, tzv. „čas 0“, (Graf 15 a Graf 16) a boli potvrdené rovnaké expresie proteínu p53 bez zásahu pridaných látok pri oboch použitých koncentráciách galaktózy.



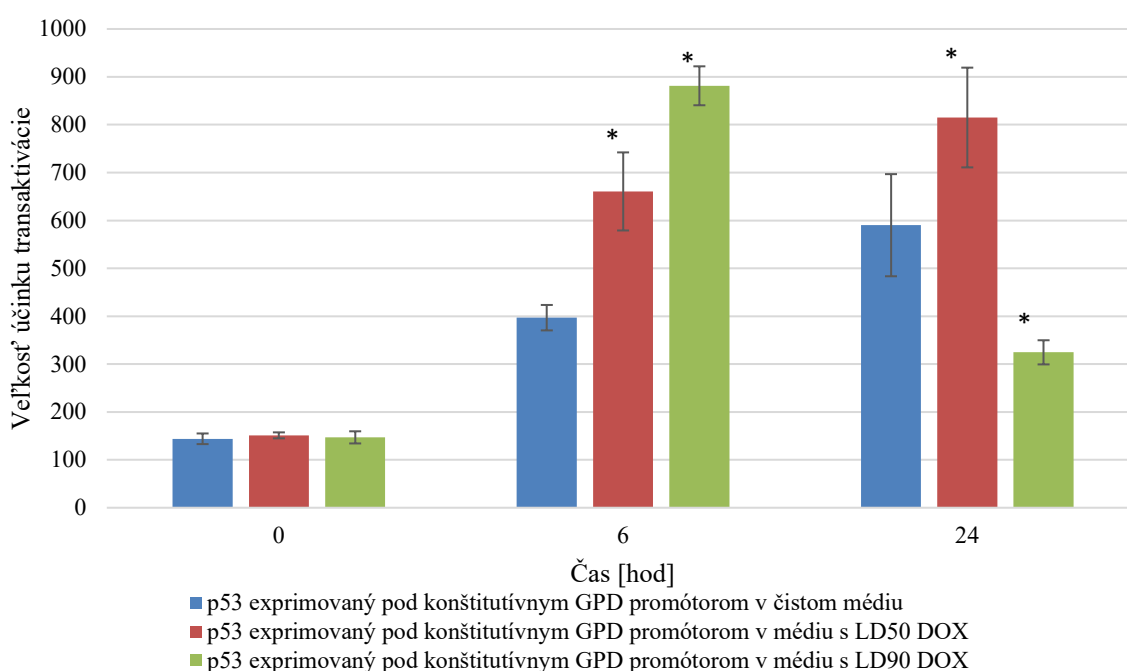
Graf 15 Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* - TT na začiatku kultivácie v SRIItA médiu v prítomnosti doxorubicínu (DOX) LD50 a LD90, kurkumínu (CUR) LD50 a LD90, resveratrolu (RES) LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní.



Graf 16: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* - TT na začiatku kultivácie v SRIItA médiu s 0,012 % galaktózou v prítomnosti doxorubicínu (DOX) LD50 a LD90, kurkumínu (CUR) LD50 a LD90, resveratrolu (RES) LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a smerodajné odchýlky z piatich opakovaní.

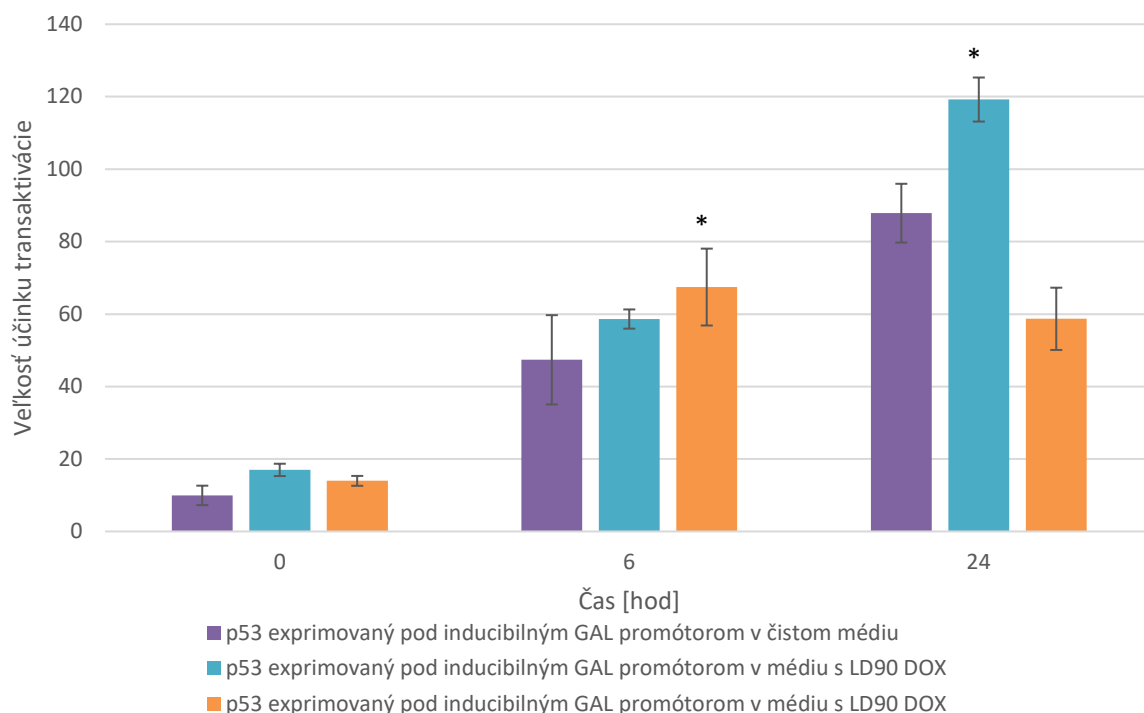
Prvou skúmanou látkou s možným vplyvom na transaktivačný potenciál proteínu p53 v jednohybridnom kvasinkovom systéme bolo cytostatikum doxorubicín (Graf 17 a Graf 18). V bunkách MCF-7 sme pomocou imunochemickej analýzy (kapitola 4.2.2) proteínov získaných z lýzy buniek ošetrovaných s doxorubicínom potvrdili zvýšenie hladiny proteínu p53. Predpokladom teda bolo, že oproti kontrole bunkám kultivovaným v čistom médiu, bude možné sledovať zvýšenie transaktivačného potenciálu proteínu p53.

Ako už bolo popísané vyššie, na počiatku inkubácie (v čase 0h) bol transaktivačný potenciál rovnaký pre všetky použité vzorky, čím bola potvrdená správnosť metódy a prípravy vzoriek. Pri konštitutívnej expresii proteínov (Graf 17) po 6 hodinách inkubácie bol zaznamenaný štatisticky výrazný nárast transaktivačného signálu, a to pri koncentrácii LD50 o cca 50% a pri LD90 až o cca 100% oproti kontrole inkubovanej v čistom médiu. Po 24 hodinách inkubácie bol zvýšený transaktivačný potenciál zaznamenaný len pri koncentrácii LD50, oproti tomu pri koncentrácii LD90 bol pozorovaný signifikantne rapídny pokles. Dôvodom môže byť vysoká toxicita doxorubicínu a s ním súvisiaca smrť buniek. Transaktivačný potenciál sa prejaví len v prípade plne funkčných proteínov [27].



Graf 17: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* - TT s konštitutívnym GPD promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti doxorubicínu s koncentraciou LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdikou ( $p$  hodnota < 0,05).

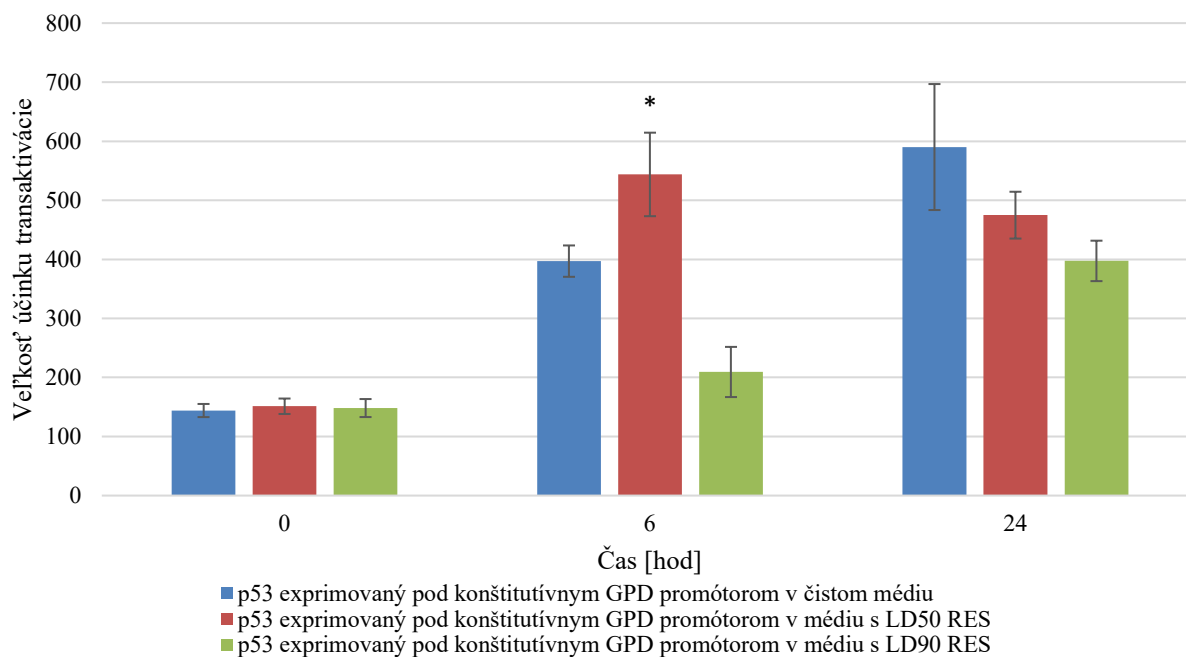
V Graf 18 sú zhrnuté výsledky experimentov s indukčibilným galaktózovým promótorom. Tieto bunky boli kultivované v prítomnosti 0,012 % galaktózy v SRItA médiu. Trend transaktivačného potenciálu u jednotlivých vzoriek je veľmi podobný výsledkom z prechádzajúceho experimentu. Cytostatikum doxorubicín teda spôsobuje zvýšenie transaktivačného potenciálu a to zvýšením hladiny proteínu p53.



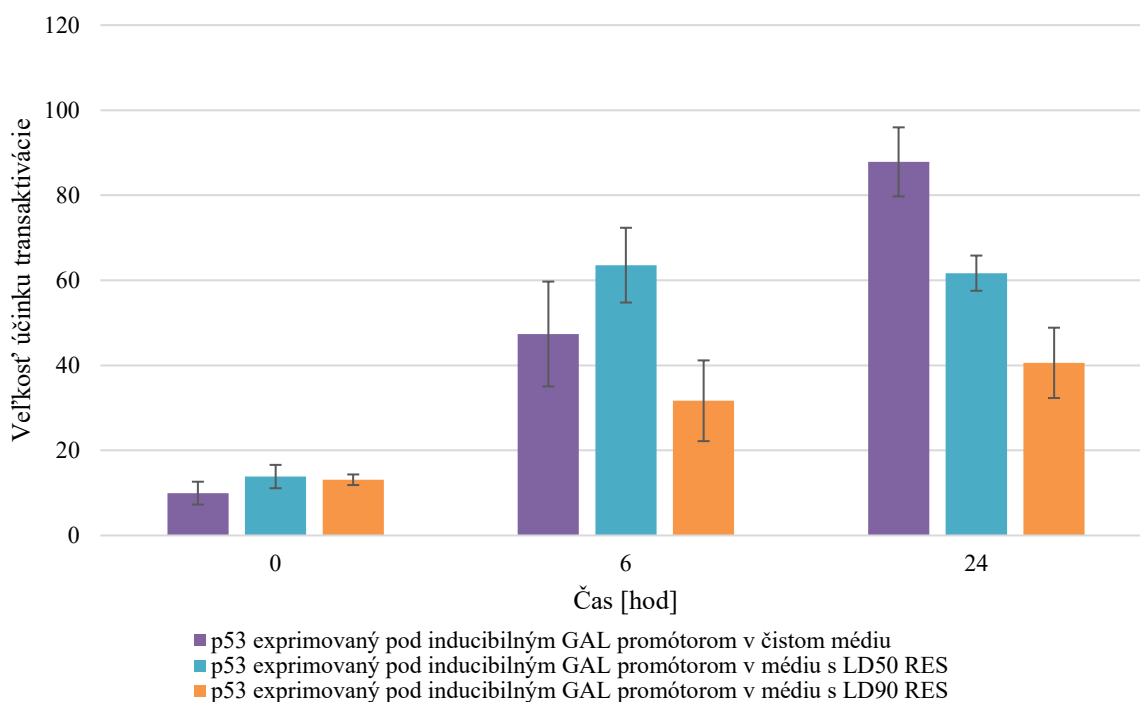
Graf 18: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae* - TT s inducibilným galaktózovým promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti doxorubicínu o koncentrácii LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdičkou ( $p$  hodnota  $< 0,05$ ).

Ďalšou skúmanou látkou, u ktorej bolo v bunkách MCF-7 potvrdené zvýšenie hladiny proteínu p53, je polyfenolická látka resveratrol, bežne sa vyskytujúca v potravinách. U resveratrolu bol využitý rovnaký postup analýzy ako pre popísaný doxorubicín. Získané výsledky sú zhrnuté v Graf 19 a Graf 20. Pri porovnaní jednotlivých histogramov je možné vidieť, že jednotlivé vzorky majú rovnaký trend transaktivačného potenciálu pri rôznych promótoroch.

Výsledky pôsobenia resveratrolu (Graf 19 a Graf 20) ukázali, že po 6 hodinách inkubácie došlo zvýšeniu transaktivačného potenciálu u buniek, ktoré boli ošetrované koncentráciou LD50 (5,6  $\mu\text{M}$ ). Avšak pri koncentrácii resveratrolu LC90 (51,6  $\mu\text{M}$ ) došlo k zníženiu transaktívácie už po 6 hodinách inkubácie. Práve pri tejto koncentrácii bol detekovaný najsilnejší signál pri imunochemickej analýze proteínového lyzátu u MCF-7 buniek. Tento pokles je pravdepodobne spôsobený včasným usmrtením buniek. Toto tvrdenie je podložené aj výsledkami získanými po 24 hodinách inkubácie. V tomto prípade resveratrol pôsobil dlhšiu dobu a tým je viditeľný vyšší vplyv na expresiu proteínu p53. Pomocou týchto výsledkov sme potvrdili apoptotické účinky resveratrolu, ktoré súvisia so zvýšením hladiny proteínu p53 v bunkách.

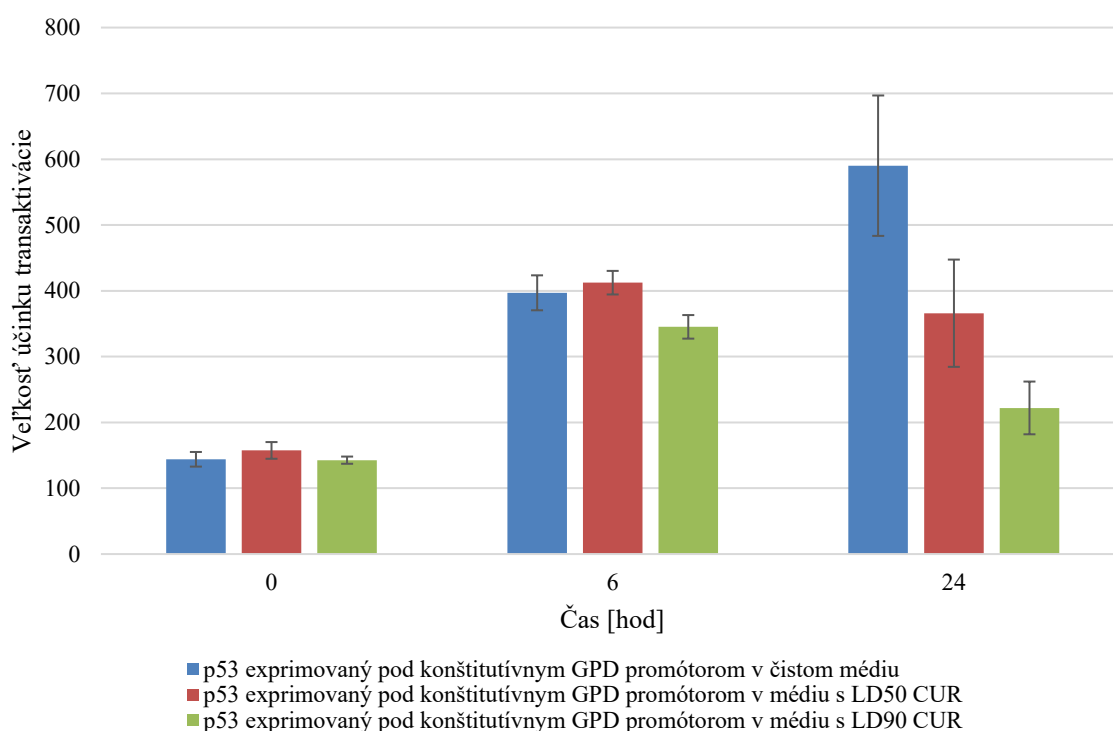


Graf 19: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae* - TT s konštitutívnym GPD promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti resveratrolu o koncentrácii LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdíčkou (p hodnota < 0,05).

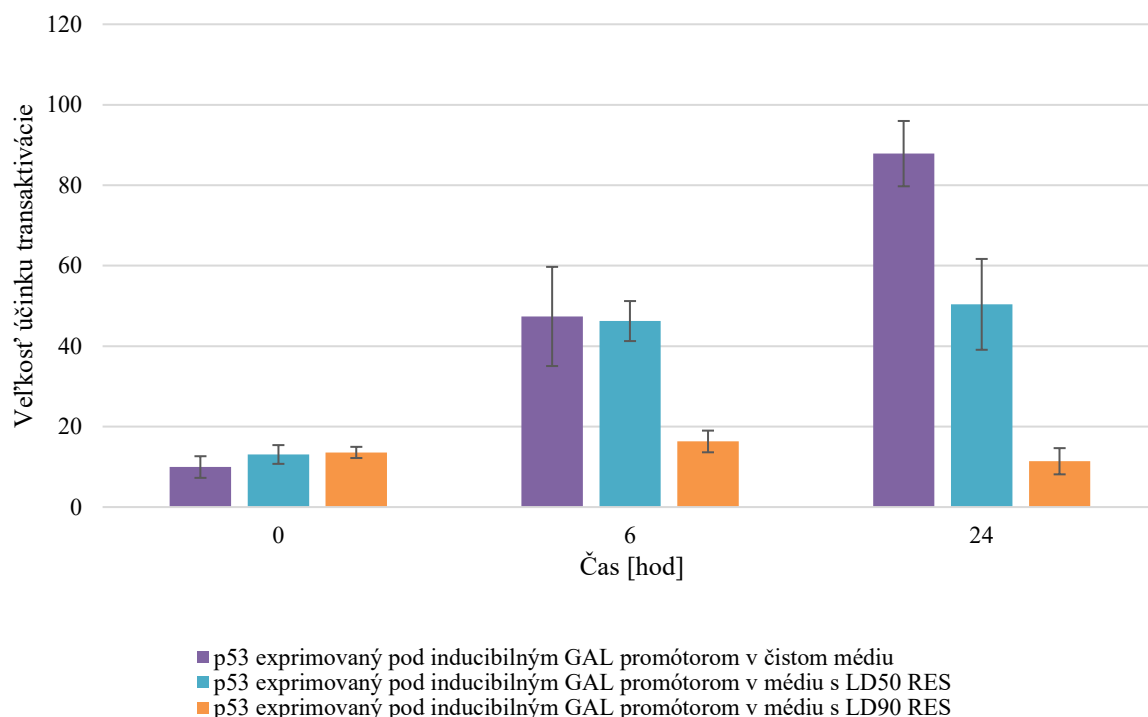


Graf 20: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae* - TT s inducibilným galaktózovým promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti resveratrolu o koncentrácii LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní. Štatistická významnosť je v grafoch znázornená hviezdíčkou (p hodnota < 0,05).

V Graf 21 a Graf 22 sú znázornené výsledky analýzy transaktivačného potenciálu proteínu p53 v bunkách *S. cerevisiae* – TT, ktoré boli kultivované v médiu s obsahom kurkumínu o koncentrácii LD50 (10,50  $\mu\text{M}$ ) a LD90 (68,21  $\mu\text{M}$ ). Experimenty na bunkách MCF-7 ukázali, že kurkumín má síce apoptotické účinky, avšak jeho mechanizmus podľa imunochemickej analýzy proteinového lyzátu z ošetrovaných buniek nie je spojená so zvýšením hladiny p53. Túto hypotézu sme potvrdili aj na kvasinkových jednohybridných systémoch s konštitutívnou expresiou proteínu pod GPD promótorom (Graf 21). Na začiatku inkubácie bol nameraný u všetkých vzoriek rovnaký signál. Po 6 hodinách bolo zistené, že koncentrácia LD50 nijak neovplyvňuje na transaktivačný potenciál oproti kontrole – bunkám kultivovaným v čistom médiu. Oproti tomu u buniek ošetrovaných s kurkumínom s koncentráciou LD90 bolo možné pozorovať nepatrný pokles signálu, ktorého dôvodom mohlo byť usmrtenie buniek. Po 24 hodinách inkubácie sme u buniek ošetrovaných kurkumínom s koncentráciou LD50 zaznamenali asi 30 % pokles signálu a pri koncentrácii LD90 až 60 % pokles oproti kontrole.



Graf 21: Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae* - TT s konštitutívnym GPD promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti kurkumínu o koncentrácii LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní.



Graf 22 Vyhodnotenie transaktivačného potenciálu proteínu p53 v jednohybridnom systéme kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae* - TT s inducibilným galaktózovým promótorom kultivovaných v SRItA médiu v prítomnosti kurkumínu o koncentracii LD50 a LD90. Histogram zobrazuje priemernú veľkosť účinku transaktivačného potenciálu v porovnaní s prázdny vektorom a štandardné odchýlky z piatich opakovaní.

Získané výsledky s konštitutívnym promótorom GPD sme preverili aj v systéme s inducibilnou expresiou proteínu p53 (Graf 22). U týchto vzoriek sme potvrdili klesajúci trend transaktivačného potenciálu po 6 hodinách u LD90 a tiež po 24 hodinách u LD50 aj LD90. Pokles u týchto vzoriek bol v porovnaní s konštitutívnou expresiou signifikantnejší, pri LD90 po 24 hodinovej inkubácii sme zaznamenali skoro 90 % pokles signálu. Pri porovnaní týchto výsledkov s výsledkami viability buniek MCF-7, je možné usúdiť, že za pokles transaktivačného signálu pri vyššej koncentrácii a dlhšej kultivácii môže toxicita kurkumínu [53]. Dôležité však je poznamenať, že ani u jednej vzorky nedošlo k nárastu transaktivačného potenciálu oproti kontrole kultivovanej v čistom médiu. Zhrnutím kurkumínových experimentov je fakt, že kurkumín nemá vplyv na hladiny proteínu p53 pri navodení programovanej bunkovej smrti alebo nekrózy [53].

## 5 Záver

V teoretickej časti diplomovej práce je pojednávané o proteíne p53, jeho štruktúre a funkcii so zameraním na mutácie. Ďalej je popísaná regulácia hladiny p53 a sú uvedené možné terapeutické prístupy na liečenie rakovinových ochorení. Súčasné terapie proti jednej z najnebezpečnejších ochorení celosvetovo sú založené na chemoterapii a ožarovaní, ktoré sú spojené s významnými vedľajšími účinkami. Preto je naliehavo potrebné vyvinúť alternatívne prístupy a prípadne nájsť dostupné zlúčeniny, ktoré sú hojne zastúpené v potrave s možnými preventívnymi a liečebnými účinkami.

V experimentálnej časti práce boli preskúvané práve najslubnejšie polyfenolické látky, resveratrol a kurkumín, ktorých účinky boli porovnané s účinkami bežne používaného protinádorového cytostatika, doxorubicínu. Experimenty boli prevedené na nádorových líniiach adenokarcinómu prsníka a na jednohybridných systémoch kvasiniek *Sacharomyces cerevisiae*. Primárne bola zistená toxicita týchto látok a ich vplyv na programovanú bunkovú smrť. Následne bola sledovaná súvislosť apoptotických účinkov so zvýšením hladiny proteínu p53, ktorý je jedným z hlavných mediátorov apoptózy. Získané výsledky boli preverené pomocou luciferázových testov transaktivačného potenciálu proteínu p53.

Predpokladaná účinnosť doxorubicínu bola jednoznačne potvrdená a v porovnaní s alternatívnymi polyfenolickými látkami bola niekoľkonásobne vyššia. Doxorubicín tiež vykazoval apoptotické účinky späté so zvýšením hladiny proteínu p53. Koncentrácia 1,4  $\mu\text{M}$  doxorubicínu v médiu (letálna dávka na 50 % buniek po 12 hodinovej inkubácii) zvýšila hladinu proteínu p53 až o 50 % oproti hladine v bunkách kultivovaných v čistom médiu. So zvyšujúcou sa koncentráciou bola sledovaná prevládajúca nekróza a apoptóza buniek, s čím súvisel aj pokles transaktivačného potenciálu v kvasinkových systémoch. Pomocou špecifickej imuchemickej metódy bolo zistené, že jedným z mediátorov apoptózy bol proteín p53.

Podobné zvýšenie transaktivačného potenciálu bolo sledované aj u resveratrolu. Po 6 hodinách inkubácie v médiu s obsahom LD50 (5,66  $\mu\text{M}$ ) resveratrolu sa transaktivačný potenciál proteínu p53 zväčšil o 40 %. Súvislosť medzi apoptózou a zvýšenou hladinou p53 bola pozorovaná tiež pomocou analýzy proteínového lyzátu u bunkách MCF-7 ošetrovaných s 30  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  resveratrolom.

Experimenty na nádorových bunkách potvrdili protinádorovú aktivitu kurkumínu. Pomocou prietokovej cytometrie bola stanovená miera apoptózy u týchto buniek ošetrovaných s koncentráciou kurkumínu LD50 (10,50  $\mu\text{M}$ ) a LD90 (68,21  $\mu\text{M}$ ). U LD50 bola táto hodnota určená na 1,54 % u LD90 až 16,07. Pri analýze hladiny proteínu p53 u týchto vzoriek však nebola zistená žiadna pozitívna zmena. Z toho vyplýva predpoklad, že kurkumín využíva iné signálne dráhy apoptózy ako zvýšenie hladiny proteínu p53 [53].

Pozitívne účinky v potrave dostupných polyfenolických látok boli v tejto práci potvrdené. Aby sa tieto alternatívne terapie mohli využiť i v medicíne je potrebné preskúmať biologickú dostupnosť týchto látok a prípadne navrhnúť vhodné kombinácie s inými polyfenolickými zlúčeninami a mikroživinami. Budúce smery výskumu by sa mali rozšíriť na používanie prírodných zlúčenín, najmä v kombináciách, ako bezpečných, efektívnych a cenovo dostupných terapeutických prístupov k liečbe rakoviny.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] C. B. Blackadar, “Historical review of the causes of cancer”, *WJCO*, roč. 7, č. 1, s. 54, 2016, doi: 10.5306/wjco.v7.i1.54.
- [2] L. Bai a W. Zhu, “p53: structure, function and therapeutic applications. J Cancer Molecules. 2006;2:141–153. 367TCTP in ovarian cancer cell lines ©Polish Society for Histochemistry and Cytochemistry Folia Histochem Cytobiol”.
- [3] K. H. Vousden a D. P. Lane, “p53 in health and disease”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, roč. 8, č. 4, s. 275–283, apr. 2007, doi: 10.1038/nrm2147.
- [4] F. Mantovani, L. Collavin, a G. Del Sal, “Mutant p53 as a guardian of the cancer cell”, *Cell Death Differ*, roč. 26, č. 2, s. 199–212, feb. 2019, doi: 10.1038/s41418-018-0246-9.
- [5] V. Brazda, P. Muller, K. Brozkova, a B. Vojtesek, “Restoring wild-type conformation and DNA-binding activity of mutant p53 is insufficient for restoration of transcriptional activity”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 351, č. 2, s. 499–506, dec. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.065.
- [6] S. Keshishyan, H. L. Nguyen, O. D. Afolabi, C. Moore, A. T. Black, a S. D. Ray, “Cytostatic Agents”, v *Side Effects of Drugs Annual*, roč. 40, Elsevier, 2018, s. 569–577. doi: 10.1016/bs.seda.2018.08.012.
- [7] A. Niedzwiecki, M. Roomi, T. Kalinovsky, a M. Rath, “Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations”, *Nutrients*, roč. 8, č. 9, s. 552, sep. 2016, doi: 10.3390/nu8090552.
- [8] X. Han, T. Shen, a H. Lou, “Dietary Polyphenols and Their Biological Significance”, *IJMS*, roč. 8, č. 9, s. 950–988, sep. 2007, doi: 10.3390/i8090950.
- [9] S. M. Meeran, A. Ahmed, a T. O. Tollefsbol, “Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy”, *Clin Epigenet*, roč. 1, č. 3–4, s. 101–116, dec. 2010, doi: 10.1007/s13148-010-0011-5.
- [10] A. J. Levine a M. Oren, “The first 30 years of p53: growing ever more complex”, *Nat Rev Cancer*, roč. 9, č. 10, s. 749–758, okt. 2009, doi: 10.1038/nrc2723.
- [11] V. Brázda a J. Coufal, “Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein”, *IJMS*, roč. 18, č. 2, s. 375, feb. 2017, doi: 10.3390/ijms18020375.
- [12] A. J. Levine, “p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division”, *Cell*, roč. 88, č. 3, s. 323–331, feb. 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81871-1.
- [13] V. Brázda *et al.*, “The structure formed by inverted repeats in p53 response elements determines the transactivation activity of p53 protein”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, roč. 483, č. 1, s. 516–521, jan. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.113.
- [14] M. A. Sammons, T.-A. T. Nguyen, S. S. McDade, a M. Fischer, “Tumor suppressor p53: from engaging DNA to target gene regulation”, *Nucleic Acids Research*, roč. 48, č. 16, s. 8848–8869, sep. 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa666.
- [15] T. Brandt, M. Petrovich, A. C. Joerger, a D. B. Veprintsev, “Conservation of DNA-binding specificity and oligomerisation properties within the p53 family”, *BMC Genomics*, roč. 10, č. 1, s. 628, 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-628.
- [16] W. S. El-Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, a B. Vogelstein, “Definition of a consensus binding site for p53”, *Nat Genet*, roč. 1, č. 1, s. 45–49, apr. 1992, doi: 10.1038/ng0492-45.



- [17] E. Paleček, “Local Supercoil-Stabilized DNA Structure”, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, roč. 26, č. 2, s. 151–226, jan. 1991, doi: 10.3109/10409239109081126.
- [18] V. Brázda, L. Hároníková, J. Liao, a M. Fojta, “DNA and RNA Quadruplex-Binding Proteins”, *IJMS*, roč. 15, č. 10, s. 17493–17517, sep. 2014, doi: 10.3390/ijms151017493.
- [19] V. Brázda a M. Fojta, “The Rich World of p53 DNA Binding Targets: The Role of DNA Structure”, *IJMS*, roč. 20, č. 22, s. 5605, nov. 2019, doi: 10.3390/ijms20225605.
- [20] S. Kato *et al.*, “Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis”, *PNAS*, roč. 100, č. 14, s. 8424–8429, júl. 2003, doi: 10.1073/pnas.1431692100.
- [21] D. Adamson, W. Thompson, A. Dawson, B. Bennett, a N. Haites, “p53 mutation and expression in lymphoma”, *Br J Cancer*, roč. 72, č. 1, s. 150–154, júl. 1995, doi: 10.1038/bjc.1995.292.
- [22] E. V. Koonin, I. B. Rogozin, a G. V. Glazko, “P53 Gain-of-Function: Tumor Biology and Bioinformatics Come Together”, *Cell Cycle*, roč. 4, č. 5, s. 686–688, máj. 2005, doi: 10.4161/cc.4.5.1691.
- [23] C. L. Brooks a W. Gu, “p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond”, *Molecular Cell*, roč. 21, č. 3, s. 307–315, feb. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.01.020.
- [24] J. A. Mietz, T. Unger, J. M. Huibregtse, a P. M. Howley, “The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein”, *EMBO J*, roč. 11, č. 13, s. 5013–5020, dec. 1992.
- [25] D. L. Narayanan, R. N. Saladi, a J. L. Fox, “Review: Ultraviolet radiation and skin cancer: UVR and skin cancer”, *International Journal of Dermatology*, roč. 49, č. 9, s. 978–986, aug. 2010, doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x.
- [26] S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, a B. B. Aggarwal, “Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?”, *Free Radical Biology and Medicine*, roč. 49, č. 11, s. 1603–1616, dec. 2010, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- [27] V. Andreotti *et al.*, “p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system”, *PLoS One*, roč. 6, č. 6, s. e20643, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0020643.
- [28] O. Laptenko a C. Prives, “Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities”, *Cell Death Differ*, roč. 13, č. 6, s. 951–961, jún. 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401916.
- [29] Y. Liu, O. Tavana, a W. Gu, “p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian”, *Journal of Molecular Cell Biology*, roč. 11, č. 7, s. 564–577, júl. 2019, doi: 10.1093/jmcb/mjz060.
- [30] J.-P. Kruse a W. Gu, “Modes of p53 regulation”, *Cell*, roč. 137, č. 4, s. 609–622, máj. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.04.050.
- [31] J.-C. Marine, S. Francoz, M. Maetens, G. Wahl, F. Toledo, a G. Lozano, “Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4”, *Cell Death Differ*, roč. 13, č. 6, s. 927–934, jún. 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401912.
- [32] N. Issaeva, A. Friedler, P. Bozko, K. G. Wiman, A. R. Fersht, a G. Selivanova, “Rescue of mutants of the tumor suppressor p53 in cancer cells by a designed peptide”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, roč. 100, č. 23, s. 13303–13307, nov. 2003, doi: 10.1073/pnas.1835733100.

- [33] J. F. A. Valente, J. A. Queiroz, a F. Sousa, “p53 as the Focus of Gene Therapy: Past, Present and Future”, *CDT*, roč. 19, č. 15, s. 1801–1817, okt. 2018, doi: 10.2174/1389450119666180115165447.
- [34] V. J. N. Bykov *et al.*, “Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound”, *Nat Med*, roč. 8, č. 3, s. 282–288, mar. 2002, doi: 10.1038/nm0302-282.
- [35] D. Gouas, H. Shi, a P. Hainaut, “The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy”, *Cancer Letters*, roč. 286, č. 1, s. 29–37, dec. 2009, doi: 10.1016/j.canlet.2009.02.057.
- [36] M. Wenke, *Farmacologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum, 1990.
- [37] H. H. H. Mohammed, G. E.-D. A. A. Abuo-Rahma, S. H. Abbas, a E.-S. M. N. Abdelhafez, “Current Trends and Future Directions of Fluoroquinolones”, *CMC*, roč. 26, č. 17, s. 3132–3149, aug. 2019, doi: 10.2174/0929867325666180214122944.
- [38] J. Švihovec *et al.*, *Farmakologie*. 2018.
- [39] P. Klener a P. Klener, *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*. Praha: Grada, 2010.
- [40] L. Petruželka a B. Konopásek, *Klinická onkologie*. Praha: Karolinum, 2003.
- [41] U. P. Mohan, T. P. P.B., S. T. A. Iqbal, a S. Arunachalam, “Mechanisms of Doxorubicin-Mediated Reproductive Toxicity – A Review”, *Reproductive Toxicology*, s. S0890623821000630, apr. 2021, doi: 10.1016/j.reprotox.2021.04.003.
- [42] S. Sritharan a N. Sivalingam, “A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin”, *Life Sciences*, roč. 278, s. 119527, aug. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119527.
- [43] N. M. Ali *et al.*, “Synthetic curcumin derivative DK1 possessed G2/M arrest and induced apoptosis through accumulation of intracellular ROS in MCF-7 breast cancer cells”, *Cancer Cell Int*, roč. 17, č. 1, s. 30, dec. 2017, doi: 10.1186/s12935-017-0400-3.
- [44] C. M. Lopes, A. Dourado, a R. Oliveira, “Phytotherapy and Nutritional Supplements on Breast Cancer”, *BioMed Research International*, roč. 2017, s. 1–42, 2017, doi: 10.1155/2017/7207983.
- [45] S. Malireddy *et al.*, “Phytochemical Antioxidants Modulate Mammalian Cellular Epigenome: Implications in Health and Disease”, *Antioxidants & Redox Signaling*, roč. 17, č. 2, s. 327–339, júl. 2012, doi: 10.1089/ars.2012.4600.
- [46] A. Scalbert a G. Williamson, “Dietary intake and bioavailability of polyphenols”, *J Nutr*, roč. 130, č. 8S Suppl, s. 2073S–85S, aug. 2000, doi: 10.1093/jn/130.8.2073S.
- [47] S. Sabet, A. Rashidinejad, L. D. Melton, a D. J. McGillivray, “Recent advances to improve curcumin oral bioavailability”, *Trends in Food Science & Technology*, roč. 110, s. 253–266, apr. 2021, doi: 10.1016/j.tifs.2021.02.006.
- [48] S. Hewlings a D. Kalman, “Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health”, *Foods*, roč. 6, č. 10, s. 92, okt. 2017, doi: 10.3390/foods6100092.
- [49] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, R. A. Newman, a B. B. Aggarwal, “Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises”, *Mol. Pharmaceutics*, roč. 4, č. 6, s. 807–818, dec. 2007, doi: 10.1021/mp700113r.
- [50] T. Jia *et al.*, “The differential susceptibilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to the cytotoxic effects of curcumin are associated with the PI3K/Akt-SKP2-Cip/Kips pathway”, *Cancer Cell Int*, roč. 14, č. 1, s. 126, dec. 2014, doi: 10.1186/s12935-014-0126-4.

- [51] T. M. Mitchell, "Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res.*, 62: 3868-3875, 2002", *Cancer Res*, roč. 63, č. 16, s. 5165–5166; author reply 5166-5167, aug. 2003.
- [52] R. A. Sharma *et al.*, "Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin: Biomarkers of Systemic Activity and Compliance", *Clin Cancer Res*, roč. 10, č. 20, s. 6847–6854, okt. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0744.
- [53] J. Cao *et al.*, "Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells", *Free Radical Biology and Medicine*, roč. 43, č. 6, s. 968–975, sep. 2007, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.006.
- [54] T. Choudhuri, S. Pal, M. L. Agwarwal, T. Das, a G. Sa, "Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction", *FEBS Letters*, roč. 512, č. 1–3, s. 334–340, feb. 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02292-5.
- [55] P. Jeandet, A.-C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, a M. Adrian, "Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 50, č. 10, s. 2731–2741, máj. 2002, doi: 10.1021/jf011429s.
- [56] M. G. Novelle, D. Wahl, C. Diéguez, M. Bernier, a R. de Cabo, "Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go?", *Ageing Research Reviews*, roč. 21, s. 1–15, máj. 2015, doi: 10.1016/j.arr.2015.01.002.
- [57] M. Elshaer, Y. Chen, X. J. Wang, a X. Tang, "Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms", *Life Sciences*, roč. 207, s. 340–349, aug. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.06.028.
- [58] M. Takashina *et al.*, "Different effect of resveratrol to induction of apoptosis depending on the type of human cancer cells", *International Journal of Oncology*, roč. 50, č. 3, s. 787–797, mar. 2017, doi: 10.3892/ijo.2017.3859.
- [59] H. Wu, L. Chen, F. Zhu, X. Han, L. Sun, a K. Chen, "The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4T1 Cells", *Toxins*, roč. 11, č. 12, s. 731, dec. 2019, doi: 10.3390/toxins11120731.
- [60] G. Y. Yang, J. Liao, K. Kim, E. J. Yurkow, a C. S. Yang, "Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols", *Carcinogenesis*, roč. 19, č. 4, s. 611–616, apr. 1998, doi: 10.1093/carcin/19.4.611.
- [61] S. Valcic *et al.*, "Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines"; *Anti-Cancer Drugs*, roč. 7, č. 4, s. 461–468, jún. 1996, doi: 10.1097/00001813-199606000-00011.
- [62] I. Bernatova, "Biological activities of (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-containing foods: Focus on cardiovascular and neuropsychological health", *Biotechnology Advances*, roč. 36, č. 3, s. 666–681, máj. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.009.
- [63] H. Fujiki *et al.*, "Mechanistic Findings of Green Tea as Cancer Preventive for Humans", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, roč. 220, č. 4, s. 225–228, apr. 1999, doi: 10.1046/j.1525-1373.1999.d01-38.x.
- [64] S. Harakeh, K. Abu-El-Ardat, M. Diab-Assaf, A. Niedzwiecki, M. El-Sabban, a M. Rath, "Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and cell cycle arrest in HTLV-1-positive and -negative leukemia cells", *Med Oncol*, roč. 25, č. 1, s. 30–39, mar. 2008, doi: 10.1007/s12032-007-0036-6.

- [65] J. Higdon, B. Delage, D. Williams, a R. Dashwood, “Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis”, *Pharmacological Research*, roč. 55, č. 3, s. 224–236, mar. 2007, doi: 10.1016/j.phrs.2007.01.009.
- [66] S. Devipriya, V. Ganapathy, a C. S. Shyamaladevi, “Suppression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin”, *Chem Biol Interact*, roč. 162, č. 2, s. 106–113, aug. 2006, doi: 10.1016/j.cbi.2006.04.002.
- [67] S. L. Miles, M. McFarland, a R. M. Niles, “Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease”, *Nutr Rev*, roč. 72, č. 11, s. 720–734, nov. 2014, doi: 10.1111/nure.12152.
- [68] L. Gibellini *et al.*, “Quercetin and cancer chemoprevention”, *Evid Based Complement Alternat Med*, roč. 2011, s. 591356, 2011, doi: 10.1093/ecam/neq053.
- [69] D. E. Pegg, “Viability assays for preserved cells, tissues, and organs”, *Cryobiology*, roč. 26, č. 3, s. 212–231, jún. 1989, doi: 10.1016/0011-2240(89)90016-3.
- [70] P. Kumar, A. Nagarajan, a P. D. Uchil, “Analysis of Cell Viability by the MTT Assay”, *Cold Spring Harb Protoc*, roč. 2018, č. 6, s. pdb.prot095505, jún. 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095505.
- [71] M. V. Berridge a A. S. Tan, “Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, roč. 303, č. 2, s. 474–482, jún. 1993, doi: 10.1006/abbi.1993.1311.
- [72] W. Strober, “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability”, v *Current Protocols in Immunology*, J. E. Coligan, B. E. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, a W. Strober, Ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001, s. ima03bs21. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- [73] A. L. Niles, R. A. Moravec, P. Eric Hesselberth, M. A. Scurria, W. J. Daily, a T. L. Riss, “A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers”, *Analytical Biochemistry*, roč. 366, č. 2, s. 197–206, júl. 2007, doi: 10.1016/j.ab.2007.04.007.
- [74] “Home | Flow Cytometry - A Basic Introduction”. <https://flowbook.denovosoftware.com/> (cit mar. 06, 2021).
- [75] P. Pozarowski a Z. Darzynkiewicz, “Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry”, v *Checkpoint Controls and Cancer*, roč. 281, New Jersey: Humana Press, 2004, s. 301–312. doi: 10.1385/1-59259-811-0:301.
- [76] J. P. Nolan a D. Condello, “Spectral Flow Cytometry”, *Current Protocols in Cytometry*, roč. 63, č. 1, jan. 2013, doi: 10.1002/0471142956.cy0127s63.
- [77] I. Lakshmanan a S. K. Batra, “Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method”, *Bio Protoc*, roč. 3, č. 6, mar. 2013, doi: 10.21769/bioprotoc.374.
- [78] “Gibco Cell Culture Basics - CZ”. <http://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics.html> (cit apr. 25, 2021).
- [79] C.-P. Segeritz a L. Vallier, “Cell Culture”, v *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, Elsevier, 2017, s. 151–172. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.

- [80] Ș. Comșa, A. M. Cîmpean, a M. Raica, “The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research”, *Anticancer Res*, roč. 35, č. 6, s. 3147–3154, jún. 2015.
- [81] A. V. Lee, S. Oesterreich, a N. E. Davidson, “MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years”, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, roč. 107, č. 7, s. djv073–djv073, mar. 2015, doi: 10.1093/jnci/djv073.
- [82] D. Porro, M. Sauer, P. Branduardi, a D. Mattanovich, “Recombinant Protein Production in Yeasts”, *Molecular Biotechnology*, roč. 31, č. 3, s. 245–260, 2005, doi: 10.1385/MB:31:3:245.
- [83] I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, a C. Reutellingsperger, “A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V”, *Journal of Immunological Methods*, roč. 184, č. 1, s. 39–51, júl. 1995, doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-I.
- [84] E. C. Murphy a A. J. Friedman, “Hydrogen peroxide and cutaneous biology: Translational applications, benefits, and risks”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, roč. 81, č. 6, s. 1379–1386, dec. 2019, doi: 10.1016/j.jaad.2019.05.030.
- [85] B. A. Bonsing *et al.*, “Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry”, *Cytometry*, roč. 28, č. 1, s. 11–24, máj. 1997.
- [86] “Addgene: pAG415GPD-ccdB-HA”. <https://www.addgene.org/14242/> (cit apr. 13, 2021).
- [87] “Addgene: pAG414GAL-ccdB-HA”. <https://www.addgene.org/14239/> (cit apr. 13, 2021).
- [88] W. W. Wilfinger, K. Mackey, a P. Chomczynski, “Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity”, *BioTechniques*, roč. 22, č. 3, s. 474–481, mar. 1997, doi: 10.2144/97223st01.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

DNA –	Deoxyribonukleová kyselina
A –	adenín
G –	guanín
T –	tymín
C –	cytozín
TP53 –	Tumor supresorový gén kódujúci proteín p53
Kb –	kilobáz
AMK –	aminokyselina
LOF –	„loss of function“ – strata schopnosti proteínu
GOF –	„gain of function“ – nová funkcia proteínu
mutp53 –	mutantný proteín p53
MDM2 –	Myší dvojminútový 2 homológ – negatívny regulátor p53
RNA –	Ribonukleová kyselina
dsDNA –	dvojvláknová DNA
NIH –	National Institutes of Health – „Národné ústavy zdravia“
ATCC –	americká zbierka typových kultúr
cAMP –	Cyklický adenosínmonofosfát

EGCG –	(-)- epigallokatechíngalát
EGC –	(-)-epikatechín-3-galát
mg –	miligram
l –	liter
ELISA –	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Da –	dalton
MTT –	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)
GF-AFC –	glycylfenylalanyl-aminofluórokumarín;
AFC –	aminofluórokumarín
DMEM –	Dulbecco modified Eagle medium
FBS –	fetal bovine serum – hovädzí bovinní sérum
SRItA –	Syntetické leucín tryptofán selektívne médium
GAL –	inducibilný galaktózový promótor
GPD –	konštitutívny GPD promótor
HCl –	chlorovodík
KCl –	chlorid draselný
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> –	Fosforečnan monodraselný
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O –	hexahydrát chloridu horečnatého
MgSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O –	pentahydrát síranu horečnatého
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> –	uhličitan sodný
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> –	fosforečnan disodný
NaCl –	chlorid sodný
SDS –	dodecylsulfát sodný
TEMED –	Tetrametyletyléndiamín
Tris –	trisaminometán